

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



| | | |
|--|-----------|--|
| (51) 国際特許分類 C12N 15/12, 5/10, 1/21, C12P 21/02, C07K 14/735, C12Q 1/68 // (C12P 21/02, C12R 1:91) | A1 | (11) 国際公開番号 WO95/27057 (43) 国際公開日 1995年10月12日(12.10.95) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP95/00638 (22) 国際出願日 1995年4月3日(03.04.95) (30) 優先権データ 特願平6/129487 1994年4月1日(01.04.94) JP 特願平6/222547 1994年8月24日(24.08.94) JP 特願平7/109927 1995年3月30日(30.03.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 森川 寛(MORIKAWA, Minoru)[JP/JP] 〒277 千葉県柏市南逆井3丁目5番2号 Chiba, (JP) 原田直樹(HARADA, Naoki)[JP/JP] 〒338 埼玉県浦和市栄和2丁目10番9号 Saitama, (JP) | | (74) 代理人 弁理士 湯浅恭三, 外(YUASA, Kyoza et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ, UG). 添付公開書類 国際調査報告書 |
| (54) Title : GENE CODING FOR IgG-Fc-BINDING PROTEIN (54) 発明の名称 IgGFc部結合タンパク質をコードする遺伝子 (57) Abstract A gene coding for an IgG-Fc-binding protein; a recombinant vector containing the gene; a host cell transformed by the vector; a process for producing a recombinant protein by culturing the host cell; and a recombinant protein having an IgG-Fc-binding activity produced by the above process. | | |

(57) 要約

I g G F c 部結合タンパク質 (F c γ B P) をコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換された宿主細胞、該宿主細胞を培養して得られる組換えタンパク質の製造方法、ならびに上記方法で得られる組換え I g G F c 部結合活性を示すタンパク質。

情報としての用途のみ

P C T に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に P C T 加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | | | |
|----|-----------|----|-----------|----|--------|----|---------|
| AM | アルメニア | EE | エストニア | LK | スリランカ | RU | ロシア連邦 |
| AT | オーストリア | EF | フィンランド | LR | リベリア | DE | ドイツ |
| BB | バハマ | FR | フランス | LT | リトアニア | EG | エジプト |
| BE | ベルギー | GA | ガボン | LV | ラトヴィア | SI | スロベニア |
| BG | ブルガリア | GB | イギリス | MC | モナコ | KN | セント・キッツ |
| BR | ブラジル | GE | グルジア | MD | モルドバ | ZZ | 不明 |
| BY | ベラルーシ | GR | ギリシャ | ML | マリ | TD | チャド |
| CA | カナダ | HN | ハングリー | MR | モーリタニア | CG | コンゴ |
| CC | 中央アフリカ共和国 | IE | アイルランド | MN | モンゴル | JM | ジャマイカ |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IT | イタリア | MX | メキシコ | TT | トリニダード |
| CH | スイス | JP | 日本 | NE | ニジェール | TA | タリ |
| CI | コート・ジボワール | KE | ケニア | NL | オランダ | UZ | ウズベキスタン |
| CM | コンゴ | KR | 韓国 | NO | ノルウェー | SV | エルサルバドル |
| CN | 中国 | KZ | カザフスタン | PZ | パナマ | UN | ウニ |
| CZ | チェコ | LI | リヒテンシュタイン | PT | ポルトガル | | |
| DE | ドイツ | | | RO | ルーマニア | | |
| DK | デンマーク | | | | | | |

明 細 書

I g G F c 部結合タンパク質をコードする遺伝子

技術分野

本発明は免疫グロブリンG (I g G) のF c部分と特異的に結合するタンパク
5 質であるI g G F c部結合タンパク質 (F c γ B P : F c γ B i n d i n g
P r o t e i n およびI g G F c B P と記載することもある) をコードする遺伝
子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換され
た宿主細胞、該宿主細胞を培養して得られる組換えタンパク質の製造方法、なら
びに上記方法で得られる組換えI g G F c部結合活性を示すタンパク質に関する。

10

背景技術

マクロファージは免疫担当細胞の1つとして、生体外から侵入してきた異物や
そのイムノグロブリンG (I g G) 複合体を食食作用 (p h a g o c y t o s i
15 s) により細胞内に取り込み、消化し、またリンパ球による抗体産生を誘起させ
るために、抗原提示作用を示す能力も有する。このような食食機構の主たる入口
がマクロファージの細胞表面上に存在するI g GのF cレセプター (F c γ レセ
プター : F c γ R) である。F c γ レセプターはI g GのF c部を結合するレセ
プターであるが、その本来の機能は、I g Gによっておおわれた (オプソニン化)
20 病原体あるいは抗原-I g G免疫複合体を除去することにある。

従来F c γ レセプターには大別して3種類の存在が知られており、これらはR
I、R I I、R I I Iと名付けられている (J. V. Ravetch and J. -P. Kinet, Annu. Rev. I
m m u n o l. (1991), 9:457-492)。これらのレセプターはいずれもすでにそのc D N
Aがクローニングされている。さらに、1990年~1991年にはいくつかの
25 グループによって、これらF c γ レセプターに会合しており、F c γ レセプター
がその結合物を内部に取り込むために必要な動きを始めるためのタンパク質が見
いだされ、スイッチ機構の糸口が明らかにされた (L. L. Lanier, G. Yu and J. H. P
hillips, Nature (1989), 342:803-805; T. Kurosaki and J. V. Ravetch, Nature

(1989), 342:805-807; D.G. Orioff, C. Ra, S. J. Frank, R. D. Klausner and J. -P. Kinet, Nature (1989), 347:189-191; P. Anderson, M. Caligiuri, C. O'Brien, T. Manley, J. Ritz and S. F. Schlossman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990), 87:2274-2278; T. Kurosaki, I. Gander and J. V. Ravetch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991), 88:3837-3841; L. Azzoni, M. Kamoun, T. W. Salcedo, P. Kanakaraj and B. Perussia, J. Exp. Med. (1992), 176:1745-1750; A. T. Ting, L. M. Karnitz, R. A. Schoon, R. T. Abraham and P. J. Leibson, J. Exp. Med. (1992), 176:1751-1755)。

一方、小林らはヒト小腸および大腸上皮細胞、特にゴブレット細胞に Ig G の Fc 部と特異的に結合でき、かつ従来の Fc γ レセプターとは異なるタンパク質 Fc γ BP の存在を報告した。このタンパク質の Ig G Fc 部との特異的結合はホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識物を用いて確認されている。すなわち、Fc γ BP は Ig G の Fc 部とのみ結合し、Ig G Fab、Ig A、Ig M とは結合しない。また Fc γ BP は Fc γ レセプター I、II、III 抗体と交差反応しない (K. Kobayashi, M. J. Blaser and W. R. Brown, J. Immunol. (1989), 143:2567-2574)。

さらに、彼らは Fc γ BP をヒト大腸上皮細胞から部分精製し、これを抗原としてマウスモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体と Fc γ BP が結合するだけでなく、マウス Ig G とも結合することが確認された (K. Kobayashi, Y. Hamada, M. J. Blaser and W. R. Brown, J. Immunol. (1991), 146:68-74)。

また、部分精製 Fc γ BP をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 電気泳動した後、モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析に付したところ、Fc γ BP は分子量 78 kDa のタンパク質を含む 200 kDa 以上の会合体を形成していることが明らかとなった (K. Kobayashi, Y. Hamada, M. J. Blaser and W. R. Brown, J. Immunol. (1991), 146:68-74)。

上記 Fc γ BP は Ig G の Fc 部と結合できるという点においては Fc γ レセプターと同様の性質を示す。しかしながら、Fc γ BP のタンパク質としての安定性、構造およびその生体内の役割については何ら明らかではなかった。したがって、Fc γ BP を解析し、その構造と機能を明らかにすることは極めて興味深い。

- さらに後述するように、Fc γ BPは粘液とともに粘膜上に分泌され、IgG抗体とともに、体内に侵入しようとする病原菌やウイルスなどを粘液中にトラップし、体外に排泄し易くすることで、感染防御の一端をになっていると推定される。また、炎症の起こった粘膜で過剰に産生された自己抗体は、補体系を活性化したり、マクロファージなどによる細胞障害を起こさせたりして、炎症の悪化につながるが、Fc γ BPはこのような自己抗体のFc部をブロックして炎症の進展を防ぐと推定される。このようなFc γ BPの機能から感染防御剤、および潰瘍性大腸炎やクローン病などの自己免疫疾患に対する抗（消）炎症剤や診断薬などの医薬用途に利用できる可能性を有している。
- そこでFc γ BPをこのような医薬用途に用いるにはこれを大量にかつ均一に得る必要があった。しかしながら、Fc γ BPを動物組織自体、またはその産生細胞の培養上清から単離する方法では大量に均一なFc γ BPを得ることは困難であった。したがって、遺伝子組換え技術を用いてFc γ BPを大量に製造することが望まれていた。
- 本発明者らは、Fc γ BPに対するモノクローナル抗体を用いてFc γ BPのcDNAのクローニングを行って、Fc γ BPをコードする遺伝子の塩基配列を明らかにすることに成功した。
- また、このcDNAを適当なベクターに挿入して得られる発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られる形質転換体を培養し、次いで産生された目的タンパク質を分離、精製したところ、産生タンパク質はヒトIgGと特異的に結合する性質を有していた。これによりFc γ BPを大量かつ均一に製造することができるとも明らかにした。

発明の開示

- したがって、本発明はFc γ BPをコードする遺伝子を提供する。
- 本発明はまた、Fc γ BPをコードする遺伝子を含む組換えベクターを提供する。
- 本発明はさらに、Fc γ BPをコードする遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換された原核もしくは真核宿主細胞を提供する。

本発明はさらに、Fc γ BPをコードする遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換して得られた形質転換体を培養し、産生された目的タンパク質を分離、精製することを特徴とする、Fc γ BPの製造方法を提供する。

本発明はさらに、上記製造方法で製造されたIgGFc部結合活性を示すタンパク質を提供する。

本発明はさらに、Fc γ BPをコードする遺伝子またはその一部を、Fc γ BP mRNAの合成組織を同定するためのノーザンブロット解析法またはインサイチュハイブリダイゼーション法のプローブとして使用するを提供する。

10 図面の簡単な説明

図1は、プローブQを用いて行ったFc γ BP mRNAのハイブリダイゼーションの結果を示す図（電気泳動の写真）である。

図2は、Fc γ BPの発現に用いた部分cDNA（約7.8 kbp）、ならびにクローンNZ4、C72、Y1、X1およびV11の相互の関係を示す。

15 図3は、ベクターpNV11-SRを用いて形質転換したCOS7細胞の発現するタンパク質を確認する図（生物の形態を示す写真）である。一次抗体として、AはK9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ培養上清、BはK17モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ培養上清を用いた。Cは一次抗体を加えない対照。いずれのものにも二次抗体としてHRP結合ヤギ抗マウスIgG（H+L）F

20 (ab')₂フラグメントを加えた。

図4は、ベクターpNV11-SRを用いて形質転換したCOS7細胞の発現するタンパク質のヒトIgG結合能を示す図（生物の形態を示す写真）である。いずれのものにも一次抗体としてHRP結合ヒトIgGを用いた。拮抗剤として用いた二次抗体は以下の通り；A：加えず（対照）、B：クロマトグラフィー精製ヒトIgG画分、C：クロマトグラフィー精製ヒトIgG Fc画分。

25 図5は、ベクターpNV11-SRを用いて形質転換したCOS7細胞の発現するタンパク質のヒトIgG結合能を示す図（生物の形態を示す写真）である。いずれのものにも一次抗体としてHRP結合ヒトIgGを用いた。拮抗剤として用いた二次抗体は以下の通り；D：クロマトグラフィー精製ヒトIgG Fc（a

b')₂画分、E : クロマトグラフィー精製ヒトIgM画分、F : クロマトグラフィー精製ヒト血清IgA、G : クロマトグラフィー精製ヒト分泌型IgA。

図6は、Fc γ BP mRNAのヒト組織での発現の特異性を示すノーザンブロットの図（電気泳動の写真）である。

- 5 図7は、プローブQ、AおよびYを用いて実施した大腸粘膜上皮細胞中のFc γ BP mRNAのノーザンブロット解析を示す図（電気泳動の写真）である。

図8は、Fc γ BPの全長cDNAの構造を示す図である。

- 図9は、プラスミドpiF-A53およびpiF-A8を用いて形質転換したCOS7細胞とモノクローナル抗体K9/K17混液との結合能を示す図（生物の形態を示す写真）である。A : piF-A53、B : piF-A8。

図10は、Fc γ BPのエキソン/イントロン境界領域の塩基配列の比較を示す図である。大文字（ボックス）はエキソン、小文字はイントロンを示す。また下線部は高度に保存された配列を示す。R : プリン、y : ピリミジン。

- 図11は、Fc γ BPゲノムDNAの5'側翻訳開始部位近傍の塩基配列を示す図である。大文字はエキソン、小文字はイントロンを示す。下線で示した部分はcDNAと同一の部分を、またshadeされた太文字はin frameでのTGAストップコドンおよび翻訳開始部位と推定されるATGコドンを示す。なお、数字はcDNAクローンNZ4の5'末端を+1とし、エキソンの上にのみ番号を付けた。

- 20 図12は、ヒトFc γ BPの構造と、本発明で用いた各クローンの対応する位置を示す。

- 図13は、Fc γ BPフラグメントを発現するCHO細胞を示す（生物の形態を示す写真）。（A）はメトトレキサート6.4 μ M、ナトリウムブチレート非処理；（B）はメトトレキサート6.4 μ M、5mM ナトリウムブチレート処理後を示す。

発明の詳細な説明

Fc γ BPをコードするcDNAは、例えばFc γ BPを産生する細胞などからmRNAを調製した後、既知の方法により二本鎖cDNAに変換することによ

り得られる。mRNAの供給源としては、本発明ではヒト大腸粘膜上皮細胞を用いたが、これに限らず、ヒト小腸、十二指腸、胃、顎下腺、舌下腺、総胆管、気管支などのFc γ BPが分布している組織のホモジェネートなどを用いてもよい。また、ヒト大腸癌細胞由来HT29-18-N2株およびその亜種はFc γ BPを産生していることが知られているので、これらの株化細胞をmRNAの供給源として用いてもよい。

mRNAを調製するには、例えば本発明で用いたように、AGPC法(P. Chomczynski et al. Analytical Biochem. 162:156-159, 1987)の改変法その他、Chirgwinら(Biochemistry 18:5294-5299, 1979)の方法にしたがって、全RNAを調製できる。また、他の生理活性タンパク質の遺伝子をクローン化するとき用いられた方法、例えばバナジウム複合体などのリボヌクレアーゼインヒビター存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行うことによっても実施することができる

こうして得られたmRNAから二本鎖cDNAを得るには、例えばmRNAを鋳型にして、3'末端にあるポリA鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマー、あるいはFc γ BPのアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写反応を行い、mRNAに相補的なDNA(cDNA)を合成する。

本発明では、Gubler & Hoffmanの改良法を用いて、Amersham社製またはIn Vitrogen社製のcDNA合成キットとランダムプライマーを用いて、ポリアデニル化RNAから逆転写反応によりcDNAを作製した。

このcDNAにアダプターを連結させた後、 λ gt11ベクターのEcoRI部位に挿入した。このようにして作製したcDNAライブラリーを、Stratagene社のファージin vitroパッケージングキットGigapack II Goldを用いて、 λ ファージにパッケージングした後大腸菌に発現させた。発現したcDNAのタンパク質をモノクローナル抗体をプローブとしてスクリーニングを行った。

上記クローニングに用いる抗体は、IgGFcとFc γ BPとの間の結合を阻

害する3種類のモノクローナル抗体(K9、K10、K17) (Kobayashi et al. J. Immunology 146:68-74, 1991; Kobayashi et al. J. Immunology 143:2567-2574, 1989)の中から、ウェスタンブロット解析においてFc γ BPを検出できる抗体を選択した。すなわち、非還元条件下ではK9抗体で分子量約200 kDaより大きいバンドが、還元条件下ではK17抗体で70-80 kDaと130-140 kDaにバンドがそれぞれ認められた。以上の結果より、クローニングにはこの2種の異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体を用いた。

このスクリーニングの結果、K9抗体では、約100万個のクローンより1個のクローン(プローブQと命名: 600 bp)を、またK17抗体では、約60万個のクローンより7個のクローン(そのうちの700 bpのDNA断片をプローブAと命名: 600 bpのDNA断片をプローブBと命名)を得た。

プローブQを用いて既知タンパク質のmRNAと比較することによって、Fc γ BP mRNAのサイズを推定した。その結果、Fc γ BP mRNAの分子サイズは約17 kbpであると推定された(図1)。

次いでプローブQ、AおよびBを用いて λ gt10にパッケージングした第2 cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。まずプローブA、BまたはQのいずれかとハイブリダイズするcDNAクローンを分離した。これらのうちから、Aとのみハイブリダイズするクローンを得て、Aとは反対側の末端部をプローブXとして、プローブX(約700 bp)とハイブリダイズするcDNAクローンを分離した。得られたクローンはXを中心部にし、一端にA-B領域をもっており、これをX1と命名した。続いて、クローンX1のA-B領域とは反対側の部分約800 bpをプローブYとして、再びcDNAライブラリーをスクリーニングし、プローブYとハイブリダイズするcDNAクローンを得た。このクローンをY1と命名した。クローンY1は一端にX領域の一部を有し、中心部にY領域を有する。このクローンY1のX領域とは反対側の端にある約150 bpをプローブY150とした。再びcDNAライブラリーをプローブY150を用いてスクリーニングした。この中からY150領域と反対側に最も長く伸びたクローンを選び、クローンC72とした。次に、クローンC72がもつY150領域とは反対側の端近くにある約450 bpをプローブZとし、プローブZとハイブ

リダイズする cDNA クローンを分離した。これらの中からクローン C72 と重複しない部分ができるだけ長いものを分離し、クローン NZ4 とした。

一方、A、B および Q のいずれともハイブリダイズする cDNA クローンの中から、A-B 領域の塩基配列がクローン X1 の A-B 領域の塩基配列と同一のものを選び出し、これをクローン V11 とした。

以上の 5 個のクローン、X1、Y1、C72、NZ4 および V11 の塩基配列を決定し、タンパク質のアミノ酸配列を確認したところ、ATG を開始コドンとする 1 本のオープンリーディングフレームを見いだした (図 2 参照)。

さらに、これらのクローンから Fc γ BP をコードする部分 cDNA (約 7.8 kbp) を得て、その塩基配列を決定した (配列番号 6 に塩基配列およびアミノ酸配列を示す)。

さらに、上記プローブ A、B または Q を用いたハイブリダイゼーションによるスクリーニングで得られた複数の cDNA クローンをそれぞれ大腸菌内で増幅した後、プローブ A、B、Q を用いてマッピングを行った。その結果、Fc γ BP の cDNA は全長 16.4 kbp の中に 3.5 kbp をユニットとする単位 (プローブ A、B、Q のそれぞれと相同な配列が A \rightarrow B \rightarrow Q の順に連なった単位) がタンデムに複数回繰り返した構造を有することが推定された。

そこでプローブ B とハイブリダイズする cDNA クローンについて、プローブの塩基配列の一部を PCR により増幅させ、得られたフラグメントの塩基配列を解析することにより、Fc γ BP の全長 cDNA は図 8 に示す構造を有し、配列表の配列番号 7 に示す塩基配列とアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

このようにして得られたクローン化された Fc γ BP をコードする遺伝子は適当なベクターに組み込むことにより、原核細胞または真核細胞の宿主細胞を形質転換することができる。

さらに、これらのベクターに適当なプロモーターや形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合タンパク質として発現させ、精製を容易にしたり、発現量を上げたり、また精製工程において適当な処理を施すことにより、目的タンパク質を切り出す

ことも可能である。

一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように、多形現象を示すと考えられ、この多形現象によって1個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば、塩基配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

また、配列表の配列番号6または7あるいはその一部に示すアミノ酸配列中の1個またはそれ以上のアミノ酸を欠くかまたは付加したポリペプチド、あるいはアミノ酸が1個またはそれ以上のアミノ酸で置換されたポリペプチドでもIgGFcへの結合性を有することがある。例えば、ヒトインターロイキン2(IL-2)遺伝子のシステインに相当する塩基配列をセリンに相当する塩基配列に変換して得られたポリペプチドがIL-2活性を保持することも既に公知になっている(Wang et al., Science 224:1431, 1984)。

また、真核細胞で発現させた場合、その多くは糖鎖が付加されるが、アミノ酸を1個ないしそれ以上変換することにより糖鎖付加を調節することができるが、この場合でもIgGFc部結合活性を有することがある。それゆえ、本発明におけるFcγBPの遺伝子を人工的に改変したものを用いて、得られたポリペプチドがIgGFc部結合活性を有する限り、それらのポリペプチドをコードする遺伝子はすべて本発明に含まれる。

さらに、得られたポリペプチドがIgGFc部結合活性を有し、配列番号6または7あるいはその一部に示す遺伝子とハイブリダイズする遺伝子も本発明に含まれる。なお、ハイブリダイゼーション条件は、通常行われているプローブハイブリダイゼーションの条件を適用することができる(例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。

以上のように、免疫グロブリンG(IgG)のFc部分と特異的に結合するタンパク質を発現できるDNAであれば、配列表の配列番号6または7に示すアミノ酸をコードする塩基配列に限らず、種々の修飾体のDNAが本発明に含まれるし、またその機能を有するDNA断片も本発明の遺伝子の一部であることは明白である。

本発明の発現ベクターは、複製起源、選択マーカー、プロモーター、RNA スプライス部位、ポリアデニル化シグナルなどを含む。

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌、枯草菌などが挙げられる。また、真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞として、例えばイースト、粘菌が挙げられる。あるいは、Sf9などの昆虫細胞を宿主細胞として使用してもよい。さらに、動物細胞由来の宿主細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、C127細胞および3T3細胞などが挙げられる。

以上のようにして目的とするFcγBPをコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生されたIgGFc部結合活性を有するタンパク質は細胞内または細胞外から分離し、精製することができる。

なお、本発明の目的タンパク質であるIgGFc部結合活性を有するタンパク質の分離、精製には実施例に記載する方法に限定されることなく、通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用することができる。例えば、各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析などを適宜選択、組み合わせて使用することができる。

かくして得られた組換えタンパク質が天然型FcγBPと同様のヒトIgGとの結合活性を有するかを検討したところ、ヒトIgGFcと特異的に結合することが明らかとなった。

上記したように、本発明のFcγBPの全長cDNAは図8に示す構造を有し、配列表の配列番号7に示す塩基配列とアミノ酸配列を有するものであるが、さらに本発明で用いた一連のcDNAが単一のmRNAに由来するものであることを以下のようにして再確認した。すなわち、発現に用いた5'末端cDNAを含むpNV11SRとは別のリピート構造内のcDNA断片をタンパク質発現させ、FcγBPを認識するモノクローナル抗体であるK9およびK17と反応させたところ、これらのcDNA産物がK9とK17のいずれかまたは両方により認識されることを確認した。

さらに、FcγBPのmRNAの発現の組織特異性を試験したところ、ヒト胎盤における発現が確認された。したがって、本発明のFcγBPをコードする遺

伝子またはその一部をプローブとして用いて、ノーザンブロット解析またはインサイチュハイブリダイゼーションによってFc γ BP mRNAの合成組織を同定することができる。

5 さらに、Fc γ BPの染色体遺伝子上の多型性の存在を制限酵素の利用により示し得た。

本発明のFc γ BPをコードする遺伝子を得る方法、該遺伝子を有する組換えベクターおよびこれを含有する形質転換体ならびに該形質転換体を培養して得られる目的タンパク質、ならびにそれぞれの製造方法について、以下の実施例で詳細に説明するが、この実施例によって本発明が限定されるものではない。

10

実施例

実施例1：モノクローナル抗体を用いたFc γ BPをコードする部分cDNAのクローニング（A：cDNAライブラリーの作製）

（1）ヒト大腸粘膜上皮細胞の調製

15 ヒト大腸組織片を10%FBSを含むRPMI培地でよく洗浄した後、粘膜筋板の部位から機械的に剥離させ、上皮細胞と粘膜固有層を分離した。これを中心棒に固定するようにして、10%FBS/5mM EDTA/PBS（-）中で氷冷しながら90分間スターラーで激しく攪拌し、上皮細胞を分離した。上皮細胞を含む溶液を1500rpmで10分間遠心し、細胞の沈殿を得た。

20 （2）mRNAの精製

粘膜上皮細胞からの全RNAの抽出はAGPC法（P. Chomczynski et al., Analytical Biochem., (1987) 162:156-159）を改変して行った。すなわち、細胞ペレット1mlに対し、9mlの変性溶液（4Mチオシアン酸グアニジン、25mMクエン酸ナトリウム（pH7）、0.5%サルコシル、0.1M 2-メルカプトエタノール）を加え、細胞を溶解した後、1mlの2M酢酸ナトリウム（pH4）、10mlの水飽和フェノール溶液、2mlのクロロホルム/イソアミルアルコール（49：1）を順次加えた。10秒間攪拌し、15分間氷冷した後、10,000×gで15分間遠心し、上清を回収した。上清8mlに対し、同様に0.8mlの酢酸ナトリウム、8mlの水飽和フェノール、1.6mlの

- クロロホルム／イソアミルアルコールを加え、10秒攪拌、15分氷冷、10,000×gで15分間遠心し、上清を回収した。上清7mlに対し、等量のクロロホルム／イソアミルアルコールを加え攪拌後、遠心分離により上清を得た。上清に対し、等量のイソプロパノールを加え、-20℃で30分間冷却後、10,000×gで15分間遠心し、全RNAの沈殿を回収した。

- 全RNA 1mgの溶液に溶出バッファー(10mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.1% SDS)を加え、全量で1mlとした後、OligoTex-dT30<Super>(宝酒造社製) 1mlを加え、65℃で5分間加熱し、氷上で3分間急冷した。5M NaCl 0.2mlを加え、37℃で10分間保温した後、15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を注意深く除去した。ペレットを洗浄バッファー(10mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.5M NaCl、0.1% SDS) 2.5mlに懸濁した後、15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を注意深く除去した。ペレットを滅菌水1mlに懸濁し、65℃で5分間加熱し、氷上で3分間急冷した。15,000rpmで3分間遠心分離した後、上清を回収した。50μlの5M NaClと2.5mlのエタノールを加えた後、-20℃で30分冷却し、遠心(3,000rpm、4℃)して、ポリアデニル化RNAの沈殿を回収した。

(3) cDNAの合成

- mRNAからのcDNAの合成は、GublerおよびHoffman (U. Gubler and B. J. Hoffman (1983) Gene 25:263) の改良法により、Amersham社製またはInvitrogen社製のcDNA合成キットを用いて行った。すなわち、大腸粘膜上皮細胞より調製したポリアデニル化RNA 5μgを42℃にて90分間、50ユニットのヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター、1mM dATP、1mM dGTP、1mM dCTP、0.5mM dTTP、1000ユニットのAMV逆転写酵素、ピロリン酸ナトリウムを含む緩衝液(Amersham社製) 50μl中で、750ngのランダムヘキサヌクレオチドまたは4μgのオリゴ(dT)プライマーと共にインキュベートした。この反応液50μlを4.0ユニットの大腸菌リボヌクレアーゼH、115ユニットの大腸菌

DNAポリメラーゼIを含む緩衝液(Amersham社製)中で、12℃で60分間、次いで22℃で60分間反応させた後、70℃で10分間インキュベートした。氷中に戻し、10ユニットのT4 DNAポリメラーゼを加え、37℃で10分間反応させた後、10 μ lの0.25M EDTA(pH8)を加えて
5 反応を停止させた。反応液250 μ lに対し、等量の7.5M酢酸アンモニウムと、4倍量のエタノールを加え、攪拌後、-20℃にて30分間冷却し、遠心分離によりcDNAを回収した。cDNAを10 μ lの滅菌水に溶かし、1 μ lを用いて0.8%アガロースゲル電気泳動を行い、合成の確認と濃度の定量を行った。

10 (4) アダプターの連結

上記(3)で得た合成cDNAに対して10倍量のモル比となるようにアダプター(EcoRI-NotI-BamHIアダプター、宝酒造社製)を加え、全体量の8倍量のライゲーション溶液A(ライゲーションキット、宝酒造社製)と1倍量のライゲーション溶液B(ライゲーションキット、宝酒造社製)を加えた。
15 十分攪拌した後、16℃で30分間インキュベートし、アダプターをcDNAへ連結させた。

この反応液をTAE緩衝液系で1%の低融点アガロースゲル(Sea Plaqueアガロース、宝酒造社製)で電気泳動を行い、0.5kbp以上のcDNA画分を含むゲルを回収した。この操作により、cDNAに結合しなかったアダプターも同時に除いた。回収したゲルの湿重量に対し、2倍量のTE緩衝液を加え、65℃で10分間保温し、アガロースゲルを溶解した後、全体量に対し等量のトリス飽和フェノールを加え、十分に攪拌後、氷冷した。遠心分離により水相を回収し、等量のトリス飽和フェノール処理を再び行った。遠心分離により水相を回収し、最後に等量のクロロホルムを加え、十分攪拌後遠心分離した。その後、
25 水相を回収し、1/10量の3M酢酸ナトリウム、20 μ gのグリコーゲン(ベーリンガーマンハイム社製)、2.5倍量のエタノールを加え、-20℃で30分間冷却した後、15,000rpmで10分間4℃で遠心し、cDNAの沈殿を得た。

(5) λ gt11ライブラリーの作製

上記(4)で得たアダプターを連結したcDNAを96 μ lの500mM Tris-HCl (pH7.5)、100mM MgCl₂、10mM DTT、10mM ATPからなる溶液に溶解し、40ユニットのポリヌクレオチドキナーゼを加え、37℃で60分間インキュベーションし、アダプターの5'末端をリン酸化した。反応終了後、200 μ lのTE緩衝液を加え、300 μ lのトリス飽和フェノールを加え、攪拌後、遠心分離(15,000rpm、室温、2分間)により上清を回収した。同様の遠心分離処理をトリス飽和フェノール・クロロホルム(1:1)溶液、続いて2%イソアミルアルコールを含むクロロホルム溶液によって行い、最終的に250 μ lの上清を得た。この上清に250 μ lの4M酢酸アンモニウム溶液、1250 μ lのエタノールを加え、-20℃、30分間冷却後、遠心分離(15,000rpm、4℃、10分間)により沈殿を回収した。cDNAの沈殿に1 μ gのEcoRI消化脱リン酸 λ gt11アーム(#234211、Stratagene社製)を加え、終濃度100mM Tris-HCl (pH7.6)、5mM MgCl₂、300mM NaClの溶液5 μ lに溶解した。ライゲーション溶液B (DNAライゲーションキット、宝酒造社製)を5 μ l加え、十分攪拌した後、26℃で10分間反応させた。cDNAを λ ファージにパッケージするために、cDNAを含むライゲーション反応液4 μ lを、10 μ lのFreeze/Thaw抽出液(GigapackII gold、Stratagene社製)に加え、直ちにSonic抽出液(GigapackII gold)を加え、ゆっくり攪拌した。22℃にて2時間インキュベーションした後、500 μ lのファージ希釈用溶液(5g NaCl、2g MgSO₄·7H₂O、50ml 1M Tris-HCl (pH7.5)、5ml 2%ゼラチン/リットル)と、10 μ lのクロロホルムを加え、インビトロパッケージング反応を終了した。このファージ溶液は4℃に保存し、スクリーニングに用いた。

実施例2：モノクローナル抗体を用いたFc γ BPをコードする部分cDNAのクローニング(B：抗体を用いたcDNAライブラリーのスクリーニング)

(1) スクリーニング

実施例1で作製した、 λ ファージにパッケージングをした大腸粘膜上皮細胞の cDNAライブラリーの 1×10^4 p.f.u.、 $200 \mu\text{l}$ を、一晚培養した大腸菌株 Y10907 $200 \mu\text{l}$ と混ぜ合わせ、 37°C で15分間インキュベーションした。LB培地を混合した0.8%トッパアガロースを溶解した後、 55°C に
5 保温したもの 5ml をファージと大腸菌のブレインキュベーション液に加えて混ぜ合わせ、1.5% LBアガロースプレート ($10 \times 14\text{cm}$) 上に均一に広げた。 42°C のインキュベーター中にて3.5時間保温し、小さなブラックが確認された後、あらかじめ 10mM IPTG をしみこませた後風乾させておいた
10 ナイロン強化ニトロセルロースフィルター (#BA-S85、Schleicher & Schnell 社製) を重ね、 37°C にて3.5時間保温した。フィルターをプレートからはがし、洗浄液 (0.05% Tween-20、 25mM Tris-HCl (pH7.5)、 150mM NaCl、 3mM KCl) 中、室温で30分間振とうした。次に、5%スキムミルクを含むPBS (-) 中、室温で30分間振とうし、ブロッキング処理を行った後、洗浄液にて20分間、
15 2回洗浄した。次いで、大腸粘膜上皮細胞中のFc γ BP に対して作製されたマウスモノクローナル抗体 (Kobayashi et al., J. Immunology (1991) 146:68-74 ; Kobayashi et al., J. Immunology (1989) 143:2567-2574) であるK9またはK17を含むハイブリドーマ培養上清を、ニトロセルロース膜1枚に対し 5ml に浸し、室温で2時間振とうした後、洗浄液で20分間、2回洗浄した。洗浄液
20 にて1/1000倍に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗マウスIgG (H+L) ヤギ抗血清 (ザイメット社製) 中、室温で1時間振とうした後、洗浄液で20分間、2回洗浄した。Tween-20 を含まないTBS溶液で10分間洗浄した後、 50ml のジアミノベンチジン溶液 ($1\text{mg}/\text{ml}$ 0.1M Tris-HCl (pH7.2)) と、 50ml の0.02
25 % H_2O_2 溶液と $50 \mu\text{l}$ の8% NiCl_2 溶液の混合液に浸し、陽性ブラックの検出を行った。

(2) λ DNA の抽出

K9モノクローナル抗体を用いたスクリーニングにより、約100万個のブラック中から1個の約600塩基対の挿入cDNAを含むクローンを得た。このブ

ラークをつまようじでピックアップして、200 μ lの培地(20 mM MgSO₄、0.2%マルトース、5 μ lのY1090 γ^- 大腸菌株の一晩培養懸濁液を含むLB培地)で、 λ ファージを37°C、4時間培養した。このファージを含む培養液2 μ l (1 \times 10⁷ pfu/ μ l)を、10 ml LB培地(20 mM MgSO₄と0.25 mlのY1090 γ^- 大腸菌株の一晩培養懸濁液を含む)に添加、感染させ、37°C、5時間振とう培養し、 λ ファージを増殖させた。

5~6時間培養後、溶菌を確認してから、50 μ lのクロロホルム、2 mlの5 M NaClを加え、37°C、10分間振とうした。3,500 rpm、15分間遠心した上清に対して10%となるようポリエチレングリコール6000を加え、氷上で30~60分置いた後、4°C、4,000 rpmで15分間遠心分離し、ファージを沈殿させた。沈殿を1 mlのA緩衝液(0.5% NP-40、30 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM MgCl₂、125 mM KCl、3.6 mM CaCl₂、0.5 mM EDTA、0.25%デオキシコール酸ナトリウム、60 mM 2-メルカプトエタノール)に懸濁し、100 μ g/ml RNase A、20 μ g/ml DNase Iと共に37°C、30分間インキュベートした。A緩衝液と等量のクロロホルムを加え、攪拌後、15,000 rpm、2分間、室温で遠心分離し、上清を回収した。再び同量のクロロホルムを加えて同様に遠心分離して上清を回収した。その後、上清液に50 mM Tris-HCl (pH 8)、20 mM EDTA、0.5% SDS、100 μ g/ml プロテアーゼKとなるようにそれぞれ添加し、55°C、60分間インキュベートした。 λ DNAを精製するため、定法通り順次フェノール処理、フェノール/クロロホルム処理、クロロホルム処理を行い、DNAase、プロテアーゼなどを失活させた後、1/20量の5 M NaClと1倍量のイソプロパノールを加え、cDNAフラグメントが挿入された λ DNAの沈殿を得た。

25 (3) プロブDNAの作製

上記(2)で精製したcDNAフラグメントを含む λ DNAからBamHI制限酵素部位を用いて挿入DNAを切り出し、第2 cDNAライブラリーのスクリーニングのためのプロブ(これをプロブQと命名した)とした。

同様の方法で、K17モノクローナル抗体を用いて得られた7個の λ クローン

のうち最長の挿入部（約1300塩基）をもつクローンよりBamHIによって切り出される700塩基と600塩基のDNAプローブを得た。このうちK17抗体のエピトープをコードするcDNAを含むと推定される700塩基のDNA断片をプローブA、600塩基の断片をプローブBとし、第2cDNAライブラリーのスクリーニングに用いた。

（4）ノーザンブロッティング

抗体によるスクリーニングによって得られたA、Qの各プローブが同一のmRNAとハイブリダイズすることをノーザンブロットにより確認した。

大腸粘膜上皮細胞よりAGPC法により抽出した全RNA15 μ gを4.5 μ lの滅菌水に溶かした後、2 μ lの5 \times MOPS緩衝液、3.5 μ lのホルムアルデヒド、10 μ lのホルムアミドと混合し、60 $^{\circ}$ C、15分間熱変性した後、ホルムアルデヒド存在下で1%アガロースゲル上で電気泳動した。電気泳動終了後、RNAをナイロン膜（バイオダイナA、ポール社製）へキャピラリー法にて一晩トランスファーを行った。UV架橋によりRNAをナイロン膜に固定した後、10mlのハイブリダイゼーション溶液（5 \times SSPE、5 \times Denhardt's溶液、50%ホルムアミド、0.5% SDS、100 μ g/ml熱変性サケ精子DNA）中にて42 $^{\circ}$ C、8時間、プレハイブリダイゼーションを行った。

次に抗体スクリーニングにより得られたプローブAおよびQを各々、 α [32 P] dCTPを用い、メガプライムラベリングキット（Amersham社製）によって放射性標識した。各プローブ 1×10^8 dpmを各々、5mlのハイブリダイゼーション溶液と共にプレハイブリダイゼーション処理したナイロン膜に加え、密封した後、42 $^{\circ}$ C、一晩ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜の洗浄は0.2 \times SSC、0.2% SDSを含む溶液中で、65 $^{\circ}$ C、40分間の洗浄操作を3回繰り返し行った。ナイロン膜を乾燥後、X線フィルムに一晩露光した。

25

以上の方法より、プローブAおよびQを用いて推定約17kbpのバンドが一本それぞれ検出され、2種類のプローブが分子量的に同一のmRNAとハイブリダイズすることを確認した。

実施例3：FcγBPをコードするcDNAの第2のクローニング（A：cDNAライブラリーの作製）

（1）ヒト大腸粘膜上皮細胞の調製

- ヒト大腸組織片を10%FBSを含むRPMI培地でよく洗浄した後、粘膜筋板の部位から機械的に剥離させ、上皮細胞と粘膜固有層を分離した。これを中心棒に固定するようにして、10%FBS/5mM EDTA/PBS（-）中で氷冷しながら90分間スターラーで激しく攪拌し、上皮細胞を分離した。上皮細胞を含む溶液を1500rpmで10分間遠心し、細胞の沈殿を得た。

（2）mRNAの精製

- 10 粘膜上皮細胞からの全RNAの抽出はAGPC法（P. Chomczynski et al., Analytical Biochem., (1987) 162:156-159）を改変して行った。すなわち、細胞ペレット1mlに対し、9mlの変性溶液（4Mチオシアン酸グアニジン、25mMクエン酸ナトリウム（pH7）、0.5%サルコシル、0.1M 2-メルカプトエタノール）を加え、細胞を溶解した後、1mlの2M酢酸ナトリウム
- 15 （pH4）、10mlの水飽和フェノール溶液、2mlのクロロホルム/イソアミルアルコール（49：1）を順次加えた。10秒間攪拌し、15分間氷冷した後、10,000×gで15分間遠心し、上清を回収した。上清8mlに対し、同様に0.8mlの酢酸ナトリウム、8mlの水飽和フェノール、1.6mlのクロロホルム/イソアミルアルコールを加え、10秒間攪拌、15分氷冷、10,000×gで15分間遠心し、上清を回収した。上清7mlに対し、等量のクロロホルム/イソアミルアルコールを加え攪拌後、遠心分離により上清を得た。上清に対し、等量のイソプロパノールを加え、-20℃で30分間冷却後、10,000×gで15分間遠心し、全RNAの沈殿を回収した。

- 25 全RNA1mgの溶液に溶出バッファー（10mM Tris-HCl（pH7.5）、1mM EDTA、0.1% SDS）を加え、全量で1mlとした後、OligoTex-dT30<Super>（宝酒造社製）1mlを加え、65℃で5分間加熱し、氷上で3分間急冷した。5M NaCl 0.2mlを加え、37℃で10分間保温した後、15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を注意深く除去した。ペレットを洗浄バッファー（10mM Tris-H

C1 (pH 7.5)、1mM EDTA、0.5M NaCl、0.1% SDS) 2.5mlに懸濁した後、15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を注意深く除去した。ペレットを滅菌水1mlに懸濁し、65℃で5分間加熱し、氷上で3分間急冷した。15,000rpmで3分間遠心分離した後、上清を回収した。50μlの5M NaClと2.5mlのエタノールを加えた後、-20℃で30分冷却し、遠心(3,000rpm、4℃)して、ポリアデニル化RNAの沈殿を回収した。

(3) cDNAの合成

mRNAからのcDNAの合成は、GublerおよびHoffmanの改良法により、Amersham社製またはInvitrogen社製のcDNA合成キットを用いて行った。すなわち、大腸粘膜上皮細胞より調製したポリアデニル化RNA 5μgを42℃にて90分間、50ユニットのヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター、1mM dATP、1mM dGTP、1mM dCTP、0.5mM dTTP、100ユニットのAMV逆転写酵素、ピロリン酸ナトリウムを含む緩衝液(Amersham社製) 50μl中で、750ngのランダムヘキサヌクレオチドまたは4μgのオリゴ(dT)プライマーと共にインキュベートした。この反応液50μlを4.0ユニットの大腸菌リボヌクレアーゼH、115ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼIを含む緩衝液(Amersham社製)中で、12℃で60分間、次いで22℃で60分間反応させた後、70℃で10分間インキュベートした。氷中に戻し、10ユニットのT4 DNAポリメラーゼを加え、37℃で10分間反応させた後、10μlの0.25M EDTA (pH 8)を加えて反応を停止させた。反応液250μlに対し、等量の7.5M酢酸アンモニウムと、4倍量のエタノールを加え、攪拌後、-20℃にて30分間冷却し、遠心分離によりcDNAを回収した。cDNAを10μlの滅菌水に溶かし、1μlを用いて0.8%アガロースゲル電気泳動を行い、合成の確認と濃度の定量を行った。

(4) アダプターの連結

上記(3)で得た合成cDNAに対して10倍量のモル比となるようにアダプター(EcoRI-NotI-BamHIアダプター、宝酒造社製)を加え、全

体量の8倍量のライゲーション溶液A（ライゲーションキット、宝酒造社製）と1倍量のライゲーション溶液B（ライゲーションキット、宝酒造社製）を加えた。十分攪拌した後、16℃で30分間インキュベートし、アダプターをcDNAへ連結させた。

- 5 この反応液をTAE緩衝液系で0.8%の低融点アガロースゲル（Sea Plaqueアガロース、宝酒造社製）で電気泳動を行い、約4kbp以上のcDNA画分を含むゲルを回収した。この操作により、cDNAに結合しなかったアダプターも同時に除いた。回収したゲルの湿重量に対し、2倍量のTE緩衝液を加え、65℃で10分間保温し、アガロースゲルを溶解した後、全体量に対し等
- 10 量のトリス飽和フェノールを加え、十分に攪拌後、氷冷した。遠心分離により水相を回収し、等量のトリス飽和处理を再び行った。遠心分離により水相を回収し、最後に等量のクロロホルムを加え、十分攪拌後遠心分離した。その後、水相を回収し、1/10量の3M酢酸ナトリウム、20μgのグリコーゲン（ベーリンガーマンハイム社製）、2.5倍量のエタノールを加え、-20℃で30分間冷却
- 15 した後、15,000rpmで10分間4℃で遠心し、cDNAの沈殿を得た。

（5）λgt10ライブラリーの作製

- 上記（4）で得たアダプターを連結したcDNAを96μlの500mM Tris-HCl（pH7.5）、100mM MgCl₂、10mM DTT、10mM ATPからなる溶液に溶解し、40ユニットのポリヌクレオチドキナー
- 20 ーゼを加え、37℃で60分間インキュベーションし、アダプターの5'末端をリン酸化した。反応終了後、200μlのTE緩衝液を加え、300μlのトリス飽和フェノールを加え、攪拌後、遠心分離（15,000rpm、室温、2分間）により上清を回収した。同様の遠心分離処理をトリス飽和フェノール・クロロホルム（1:1）溶液、続いて2%イソアミルアルコールを含むクロロホルム
- 25 溶液によって行い、最終的に250μlの上清を得た。この上清に250μlの4M酢酸アンモニウム溶液、1250μlのエタノールを加え、-20℃、30分間冷却後、遠心分離（15,000rpm、4℃、10分間）により沈殿を回収した。cDNAの沈殿に1μgのEcoRI消化脱リン酸λgt10アーム（#233211、Stratagene社製）を加え、終濃度100mM T

Tris-HCl (pH 7.6)、5mM MgCl₂、300mM NaClの
溶液5μlに溶解した。ライゲーション溶液B (DNAライゲーションキット、
宝酒造社製)を5μl加え、十分攪拌した後、26℃で10分間反応させた。c
DNAをλファージにパッケージするために、cDNAを含むライゲーション反
5 応液4μlを、10μlのFreeze/Thaw抽出液 (GigapackII
gold、STRATAGENE社製)に加え、直ちにSonic抽出液 (G
igapackII gold)を加え、ゆっくり攪拌した。22℃にて2時間イ
ンキュベーションした後、500μlのファージ希釈用溶液 (5g NaCl、
2g MgSO₄·7H₂O、50ml 1M Tris-HCl (pH 7.5)、
10 5ml 2%ゼラチン/リットル)と、10μlのクロロホルムを加え、インビ
トロパッケージング反応を終了した。このファージ溶液は4℃に保存し、スクリ
ーニングに用いた。

実施例4：FcγBPをコードする全長cDNAのクローニング (B：DNA
15 プローブを用いたcDNAライブラリーのスクリーニング)

(1) プロットティング

λファージにパッケージングを行った大腸粘膜上皮細胞のcDNA (2×10⁴
4 pfu)を、一晚培養した大腸菌株C600 hfl 200μlに感染させた
後、37℃で15分間保温した。55℃に保温した0.8%トッパアガロース/
20 LB培地を加えた後直ちにLBプレート (10×14cm)上に広げた後、37
℃にて12時間インキュベートした。プラークの直径が1mm程度になったとこ
ろで、ナイロン膜 (Biodyne A、孔径0.2μm、ポール社製)を重ね、
4℃、10分間冷却した。ナイロン膜をプレートよりはがし、プロットティング溶
液I (0.5M NaOH、1.5M NaCl)、プロットティング溶液II (1
25 M Tris-HCl (pH 7.4))、プロットティング溶液III (0.5M
Tris-HCl (pH 7.4)、1.5M NaCl)で各々5分間処理した
後、UVクロスリンク装置 (UV Stratalinker 2400、STR
ATAGENE社製)を用いて1200μジュールにてDNAをナイロン膜に固
定した。

(2) ハイブリダイゼーション

λ DNAを固定したナイロン膜1枚当り、10 mlのハイブリダイゼーション溶液(5×SSPE, 5×Denhardt's溶液、50%ホルムアミド、0.5% SDS、100 μg/ml 熱変性サケ精子DNA)を加え、ハイブリダイゼーションバッグに密封した後、42℃で8時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、抗体スクリーニングにより得られたプローブQ, A, Bを各々α [³²P] dCTPを用いてランダムプライミング法により放射性標識した。プローブQ, A, Bの各1×10⁸ dpmを5 mlのハイブリダイゼーション溶液と共にプレハイブリダイゼーションの終了したナイロン膜に加え、密封後、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。インキュベーションの終了後、ナイロン膜を0.2×SSC、0.2% SDSの溶液で65℃40分間洗浄する操作を3回くり返した後、X線フィルムに一晩露光した。

以上のスクリーニングにより、プローブA, B, Qの1種または、複数とハイブリダイズする69個のラムダクローンを得た。それぞれから、前述の通りの方法でλ DNAを調製し、制限酵素EcoRIで処理した後、電気泳動し、挿入DNAのサイズの確認を行った。

実施例5: FcγBP mRNAのサイズ推定

実施例2で得たプローブQを用いてFcγBP mRNAのサイズを推定した。

20 比較のための既知タンパク質のmRNAとして、14.0 kbpのDystrophin mRNA (M. Koenig et al. (1988) Cell 53:219-228) と、15.2 kbpのRyanodine Receptor mRNA (F. Zarzato et al. (1990) J. Biol. Chem., 265:2244-2256) を用いた。これらの対照mRNAに対するcDNAプローブは、いずれも文献から得られる塩基配列をもつ合成プローブを調製し、これらを用いてポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法により作製し、それぞれプローブDYSおよびプローブRDRとした。

Dystrophin mRNAとRyanodine Receptor mRNAの供給源はヒト骨格筋ポリアデニル化RNA (Clontech社製)である。

大腸粘膜上皮細胞より得られたポリアデニル化RNA 2 μ gまたはヒト骨格筋ポリアデニル化RNA 1 μ g、あるいは両者の混合物を実施例2の(4)と同様の方法で電気泳動を行い、ナイロン膜上にトランスファーした。このナイロン膜をプローブQを用いてハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィーにより検出した。

次いで同じ膜で対照mRNAのハイブリダイゼーションを行うため、このナイロン膜を50mM Tris-HClバッファー(pH7.5)、1.25mM EDTA、3xSSC、1XDenhardt's溶液、1%SDS、50%ホルムアミドを含む溶液20mlとともに、70℃、1時間インキュベーションした。次いで、0.2xSSC、0.1%SDSを含む洗浄液で室温、10分間振とうし洗浄する操作を2回行った。その後、ナイロン膜でオートラジオグラフィーを行い、バンドの消失されたこと(デハイブリダイゼーション)を確認した。

次に、上記と同様の方法にて、プローブDYSによるハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィーにより検出した。このナイロン膜を上記と同様の方法でデハイブリダイゼーションを行った後、オートラジオグラフィーでバンドの消失されたことを確認した。最後にプローブRDRによるハイブリダイゼーションを同様に行い、オートラジオグラフィーによるバンドの検出を行った。

以上の結果より得られたDystrophin mRNA、Ryanodine Receptor mRNAの各バンドの移動度を分子サイズに対してプロットを行い、標準曲線を得て、Fc γ BP mRNAの移動度よりその分子サイズを約17kbpと推定した(図1)。

実施例6：Fc γ BPをコードするcDNAの塩基配列の決定(1)

IgGFc部結合能をもつタンパク質のアミノ酸配列をコードする領域の塩基配列を決定するために、上記実施例4で得られた69個のスクローンの中から、必要な5個のクローンを以下の方法で選択し、DNAシーケンサー(モデル373A、Applied Biosystems社製)で塩基配列を決定した。

(1) クローンX1

プローブA、BおよびQとのハイブリダイゼーションによるスクリーニングに

より得られたcDNAクローンの中で、プローブQおよびBとはハイブリダイズせず、プローブAとのみハイブリダイズするクローンを得た。このクローンの挿入cDNAの中でプローブAとは反対側の末端でEcoRIとSmaIによって切り出される約700bpのフラグメントを回収し、これをプローブXとした。

- 5 次に、プローブXを用いて実施例3と同様の方法でcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、プローブXおよびプローブA、BとハイブリダイズするクローンX1を得た。そして、クローンX1の挿入部cDNAをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約3300bpのDNAを分離した後回収し、プラスミドベクターpBluescript SK(+)のEcoRI部位に挿入
- 10 した。この後、制限酵素地図の作製および塩基配列の決定を行った。

(2) クローンY1

- クローンX1のcDNAの中で、プローブBを含む部分とは反対側でEcoRIとSacIによって切り出される約800bpのフラグメントを回収し、これをプローブYとした。プローブYを用いて実施例3と同様の方法でcDNAライ
- 15ブラリーのスクリーニングを行い、得られたクローンのうち、最長のcDNAをもつクローンであるクローンY1を得た。そして、クローンY1の挿入部cDNAをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約1900bpのDNAを分離した後回収し、プラスミドベクターpBluescript SK(+)のEcoRI部位に挿入した。この後、制限酵素地図の作製および塩基配列の決
- 20 定を行った。

(3) クローンC72

- クローンY1のcDNAの中で、プローブXを含む部分とは反対側でSacIとSphIによって切り出される約150bpのフラグメントを回収し、これを
- 25 プローブY150とした。プローブY150を用いて実施例3と同様の方法でcDNAライブラリー(cDNAサイズが2から4kbpのもの)のスクリーニングを行い、9個のクローンを得た。得られたクローンの挿入cDNA部分の中で、Y150を境としてY領域とは反対側に最も長く伸び、かつY150を含むcDNAを得て、これをクローンC72とした。そして、クローンC72の挿入部cDNAをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約1200bpの

DNAを分離した後回収し、プラスミドベクターpBluescript SK (+) のEcoRI部位に挿入した。この後、制限酵素地図の作製および塩基配列の決定を行った。

(4) クローンNZ4

- 5 クローンC72の挿入部cDNAの中で、プローブY150を含む部分とは反対側でEcoRIとSacIによって切り出される約450bpのフラグメントを回収し、これをプローブZとした。ヒト大腸癌由来培養細胞HT29-18-N2株を用いて、実施例3(2)-(5)と同様の方法でλgt10 cDNAライブラリーを作製し、プローブZを用いて実施例3と同様にスクリーニングを行
10 い、4個のクローンを得た。得られたクローンのうち、C72と重複しない部分を最も長く含むクローンNZ4を得た。そして、クローンNZ4の挿入部cDNAをNotIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約900bpのDNAを分離した後回収し、プラスミドベクターpBluescript SK (+) のEcoRI部位に挿入した。この後、制限酵素地図の作製および塩基配列の決
15 定を行った。

(5) クローンV11

- プローブA、BおよびQによるスクリーニングでいずれともハイブリダイズするcDNAクローンのプローブA、Bとハイブリダイズする部分の塩基配列を解析し、先に塩基配列を決定したクローンX1の末端側にあるA-B領域と同一の
20 塩基配列をもつクローンを得て、クローンV11とした。クローンV11の挿入部cDNAをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約3700bpのDNAを分離した後回収し、プラスミドベクターpBluescript SK (+) のEcoRI部位に挿入した。この後、制限酵素地図の作製および塩基配列の決定を行った。

25

実施例7: クローンNZ4がFcγBP mRNAの5'末端近傍であることの推定

実施例6で得られた5種のクローンがNZ4-C72-Y1-X1-V11の順に5'末端方向または3'末端方向に向かって伸展しているが、それらの塩基

配列をアミノ酸に翻訳したところ、5'末端方向へ伸びていることが推定された。そこで、現在最上流に位置するクローンNZ4 DNAをプローブとしてランダムプライミングで作製したライブラリーをスクリーニングしたところ、13種の独立したクローンが得られたが、NZ4よりも5'側に伸長したクローンは得られなかった。また、NZ4の塩基配列をアミノ酸へ翻訳したところ、オープンリーディングフレーム上、予想される最も5'上流に位置するメチオニンに対するATGコドン近傍はKozak則に類似していたため、このATGが開始メチオニンである可能性が示唆された。しかし、このATGコドンの最初のAは、クローンNZ4では僅か9番目に位置し、その9塩基内にはin frameにストップコドンは存在しないことから転写産物のみならず翻訳レベルでも5' (N末端) 方向へcDNAの配列が伸長している可能性を否定できない。したがって、プライマーエクステンション法により転写開始部位の検証ならびに翻訳開始部位を推定する目的で以下の実験を行った。

(1) 全RNAとポリアデニル化RNAの調製

- 15 ヒト大腸粘膜上皮細胞およびHT29-18-N2細胞から、実施例1の(2)または実施例3の(2)と同様に全RNAとポリアデニル化RNAを調製した。

(2) エクステンションプライマーの合成

- 2種のプライマー、プライマー1: GCTGATAGTTCTGCAGGAA
GGCTGTGAGGAATTCTCTCTGCCAGTGTT-50mer、
20 プライマー2: GCTCCAGCCCAGAGTATCCACCAGCTCCATAGG-33merは、DNA合成機 (Model 394、Applied Biosystems社製) にて合成し、OPCカラム (Applied Biosystems社製) にて精製した。各プライマー100 pmolを γ [32 P] ATPにてT4ポリヌクレオチドキナーゼにより末端ラベルし、Micro spinTMS-200HRカラム (Pharmacia社製) により精製し、各
25 0.5 pmolを各反応に用いた。

(3) プライマーアニーリングとエクステンション反応

ヒト大腸粘膜上皮細胞およびHT29-18-N2由来の全RNA (20 μ g) とポリアデニル化RNA (2.5 μ g) をそれぞれプライマーとアニーリングバッ

ファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 250 mM KCl) 中で混合し、95℃、5 分間加熱変性し、58℃、1 時間、さらに室温または 37℃で 1.5 時間インキュベートすることによりハイブリダイゼーションを行った。続いて、エクステンション反応を行うため、アニーリングサンプルをエタノール沈殿し、この沈殿を RTase バッファー (33 mM Tris-HCl, pH 8.3, 20 mM KCl, 13.3 mM MgCl₂, 13.3 mM DTT, 0.33 mM dNTPs, 50 µg/ml アクチノマイシン D) に溶解後、20 unit の逆転写酵素 (RNase H-free MM LV RTase, TOYOBO 社製) を加え、42℃、1 時間インキュベートした。反応後、95℃で 3 分処理し RTase を失活させた後、10 µg/ml となるように RNase A を加え、37℃、30 分間インキュベートしてテンプレート RNA を分解した。その後フェノール/クロロホルム、クロロホルム抽出、エタノール沈殿を順次行った後、5% のシーケンスゲルにて泳動し、泳動後ゲルは固定液 (10% 酢酸、15% メタノール) で処理し、乾燥後オートラジオグラフィを行った。なお、マーカーとして M13mp18 をシーケンエーゼ ver 2.0 DNA シーケンシングキット (TOYOBO 社製) で反応させたものを用いた。

以上の方法により次に述べる結果が得られた。いずれの全 RNA 標品をテンプレートとして用いても、プライマー 1 でのエクステンションの結果、プライマーより 118 塩基付近の位置に強いバンドが見られ、またいずれのポリアデニル化 RNA 標品をテンプレートに用いたものでも 118 塩基付近だけでなく、157 塩基付近の位置に弱いエクステンションバンドが見られた。現在最も 5' 側のクローンと考えられる NZ4 の 5' 末端を便宜上 +1 とすると、これらはそれぞれ +27、-13 に相当した。この +27 でエクステンション反応が止まった理由として、NZ4 の 5' 末端近傍の 2 次構造の形成を予測させるパリンδροミックな構造が存在することが挙げられる。事実できるだけそうした 2 次構造を抑える目的で合成したより 5' 側にあるプライマー 2 での結果では -10 から -16 付近にかけて強いブロードなバンドが、さらに -23 に相当する位置に弱いシングルバンドが検出された。そして、-23 より高分子領域にはバンドは検出されな

かった。

以上の結果から、NZ 4の5'末端より10から20塩基上流付近に転写開始部位の存在が示唆され、この範囲にin frameでのATGコドンが存在しない場合には現在ORF上最も5'端にあるATGが翻訳開始部位である可能性が強く推定された。これらの事実はクローンNZ 4がNZ 4-C 72-Y 1-X 1-V 11の順で極めてN末端に近いことを示している。

実施例8：発現cDNA／ベクター系の構築（A：発現に用いた部分cDNAの調製）

10 タンパク質発現のために、FcγBPの部分cDNAの挿入されたλDNAクローン（#NZ 4、#C 72、#Y 1、#X 1、#V 11）を、EcoRIまたはNotIにて切断した後、挿入部のcDNAを還状プラスミドpBluescript SK（+）へサブクロニングし、それぞれpNZ 4、pC 72、pY 1、pX 1、pV 11と命名した。

15 （1）pNZ 4：λクローン（#NZ 4）をNotIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約900bpの挿入部を分離・精製し、pBluescript SK（+）のNotI部位に結合させた。cDNAのタンパク質コードストランドの5'→3'方向がプラスミド中のLacZ遺伝子の方向と逆向きに挿入されたクローンを選択した。挿入部の全塩基配列を配列番号1に示す。

20 なお、本発明の塩基配列表においては、cDNA由来の塩基配列を大文字で、pBluescript SK（+）由来の塩基配列を小文字で、また合成アダプターおよび合成オリゴヌクレオチド由来の塩基配列を小文字のアンダーラインでそれぞれ示した。

また、アミノ酸配列は、Kozak配列と一致するATGを開始コドンとし、
25 塩基配列よりユニバーサルコドンにより推定した配列を示した。

（2）pC 72：λクローン（#C 72）をEcoRIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約1300bpの挿入部を分離・精製し、pBluescript SK（+）のEcoRI部位に結合させた。cDNAの5'→3'方向がプラスミド中のLacZ遺伝子の方向と逆向きに挿入されたクローンを

選択した。挿入部の全塩基配列を配列番号2に示す。

- (3) pY1: λ クローン(#Y1)をEcoRIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約1900bpの挿入部を分離精製し、pBlue-script SK(+)のEcoRI部位に結合させた。同じサイズのDNA挿入部をもつクローンを選択した。挿入部の全塩基配列を配列番号3に示す。

(4) pX1: λ クローン(#X1)をEcoRIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約3300bpの挿入部を分離・精製し、pBlue-script SK(+)のEcoRI部位に結合させた。同じサイズのDNA挿入部をもつクローンを選択した。挿入部の全塩基配列を配列番号4に示す。

- 10 (5) pV11: λ クローン(#V11)をEcoRIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約3700bpの挿入部を分離・精製し、pBlue-script SK(+)のEcoRI部位に結合させた。同じサイズのDNA挿入部をもつクローンを選択した。挿入部の全塩基配列を配列番号5に示す。

- 15 実施例9: 発現cDNA/ベクター系の構築 (B: タンパク質発現のための部分cDNAの連結)

(1) pNZC7の調製

- cDNAクローンを挿入したプラスミドpNZ4 (5 μ g) を制限酵素XhoI及びBglII (各々50ユニット) で完全消化した後、低融点アガロースゲル
20 電気泳動する。Fc γ BPのcDNAの5'末端を含む約400bpのフラグメントを分離し、フェノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した(フラグメント1)。次に第2番目のプラスミドpC72 (5 μ g) をXhoIとBglIIで完全消化し、ベクター部分を含む約4.2kbpのフラグメントを同様の方法で電気泳動により単離した(フラグメント2)。フラグメント1とフラグメン
25 ト2を各々10 μ lのTE緩衝液に溶解し、各2 μ lを16 μ lのA溶液(DNAライゲーションキット、宝酒造社製)、4 μ lのB溶液と混合し、16℃にて30分間インキュベートし連結させた。この混合液5 μ lを100 μ lのコンピテントE. coli (XL1-Blue) を形質転換し、アンピシリン(100 μ g/ml)を含むLBプレート上で37℃1晩培養した。生成したコロニーよ

りプラスミドDNAを精製し、フラグメント1とフラグメント2の連結したプラスミドpNZC7を得た。

(2) フラグメント5の調製

pNZC7 (5 μ g) を各々50ユニットのXhoIとBstXIで完全消化
5 した後、電気泳動により約1300bpのフラグメントを回収した(フラグメント3)。第3番目のプラスミドpY1 (5 μ g) を各50ユニットのBstXIとHincIIで完全消化した後、電気泳動により約420bpのフラグメントを回収した(フラグメント4)。フラグメント3とフラグメント4を同様の方法でDNAリガーゼにより連結し、電気泳動を行い両者が1分子ずつBstXI部位
10 で連結した約1750bpのフラグメントを回収した(フラグメント5)。

(3) pXV2の調製

第4番目のプラスミドpX1 (5 μ g) をHincII及びBamHI (各50
ユニット) で完全消化し電気泳動により、約2780bpのフラグメントを回収した(フラグメント6)。第5番目プラスミドpV11をBamHI (50ユニッ
15 ト) で完全消化し電気泳動により約3350bpのフラグメントを回収した(フラグメント7)。フラグメント6とフラグメント7をDNAリガーゼを用いて連結させ、両者が1分子ずつ連結された約6100bpのフラグメントを電気泳動により回収した(フラグメント8)。このフラグメント8をHincIIとBamHIで消化したpBluescript SK (+) にDNAリガーゼで連結し
20 た後コンピテントE. coliを形質転換した。複数の形質転換体よりプラスミドを回収した後、各々の塩基配列を決定し、フラグメント6とフラグメント7の方向性が正しく連結されたフラグメント8を含むプラスミドクローンを得て、フラグメント8の5' \rightarrow 3' 方向がプラスミド中のLacZ遺伝子の方向と逆向きに挿入されたものをpXV2とした。

25 (4) pNV11の調製

pXV2をXhoIとHincIIで完全消化後、電気泳動的に約9.1kbpのベクター部分を含むフラグメントを回収した(フラグメント9)。フラグメント9と前記フラグメント5をDNAリガーゼを用いて連結した後、コンピテントE. coli (XL1-Blue) を形質転換した。形質転換体より、約7.8

kbpのcDNA (フラグメント10)を含む約10.8kbpのプラスミドpNV11を得た。

(5) ストップコドン (UAGに対応するもの)を含むオリゴヌクレオチドアダプターの合成

- 5 DNA合成機 (model 394, Applied Biosystems社製)を用いてフレームを異にする3個のTAGを含み、両端にNot I部位とSpe I部位をそれぞれもつ次のオリゴキシヌクレオチド、(1) 5' -CTA GTT AGT TAG TTA GGG TAC CGC-3', (2) 5' -GGC CGC GGT ACC CTA ACT AAC TAA-3' 10 を合成した。オリゴヌクレオチド1及び2各10nmolを混合し(合計146 μ l)した後、95℃、1分間、次いで85℃、10分間、次いで0.33℃/分の速さで40℃まで徐々に冷却を行い、停止コドンを含むアダプターを作製した (TA-IIIアダプター)。このアダプター (2.1nmol)の5'末端をATPとポリヌクレオチドキナーゼを用いて標準方法にてリン酸化した。
- 15 pBluescript SK (+)ベクター0.83pmolをNot IとSpe Iにて完全消化した後リン酸化したTA-IIIアダプター250pmolと混合し、DNAライゲーションキットを用いて16℃30分間インキュベートし連結させた後、エタノール沈殿した。この沈殿を50 μ l中にてNot Iで完全消化し、アダプターシーケンス1回だけ持たせるようにした後、低融点アガロースゲル電気泳動を行い約3kbpのバンドを回収し、フェノール抽出した後、エタノール沈殿を行った。得られた沈殿を、DNAライゲーションキットを用いて自己連結させた後、コンピテントE. coli (XL1-Blue)を形質転換した。アンピシリンを含むLBプレート上で一晚培養し生じたコロニーより得られたプラスミドのうち、TA-IIIアダプターが挿入されたプラスミドを選択 20 した (pBLS/TAIII)。

(6) pNV11-STの調製

5 μ gのプラスミド (pNV11)をSpe Iで完全消化した後、電気泳動的に約7.8kbpのフラグメントを回収し、10 μ lのTE緩衝液に溶解した (フラグメント11)。2 μ gのプラスミド (pBLS/TAIII)をSpe I

- で完全消化し、バクテリアアルカリホスファターゼ（2ユニット）を用いて末端を脱リン酸化した後、フェノール／クロロホルム処理を2回行い、エタノール沈殿した。沈殿を10 μ lのTE緩衝液に溶解した（フラグメント12）。各2 μ lのフラグメント10とフラグメント11を混合し、DNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた後、コンピテントE. coli（XL1-Blue）を形質転換し、アンピシリンを含むLBプレート上で一晚培養した。生じたコロニーのうち、挿入したcDNAの3'末端側にTA-IIIアダプターが連結されているプラスミドを制限酵素地図及び塩基配列を調べる事により選択した。得られたクローンがpNV11-STである。
- 10 前記プラスミドpNV11-STを含有する大腸菌は*Escherichia coli* XL1-Blue [pNV11-ST]として工業技術院生命工学技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成6年4月1日に生命研条寄第4625号（FERM BP-4625）としてブタベスト条約に基づき国際寄託された。
- 15 なお、Fc γ BPの発現に用いた部分cDNA（クローンpNV11-ST）（約7.8 kbp）、ならびにその構築に用いた実施例6に記載のクローンNZ4、C72、Y1、X1およびV11の相互の関係を図2に示す。

- 実施例10：発現cDNA／ベクター系の構築（C：タンパク質発現ベクターへの組込み）
- 20

（1）pcDL-SR α /NOTベクターの作製

- cDNAの組込みを行えるよう次の様にpcDL-SR α 296ベクター（国立予防衛生研究所、武部豊博士より恵与された：以下SR α と記載することもある）の制限酵素部位を改変した。まず、2 μ gのSR α をEcoRIで完全消化
- 25 した後、エタノールで沈殿した。沈殿をKlenow緩衝液（70mM Tris·HCl（pH7.5）、1mM EDTA、200mM NaCl、70mM MgCl₂、各1mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP）に溶解し、0.4ユニットのKlenowフラグメントと共に37℃15分間インキュベートし、プラスミドの末端を平滑化した。エタノール沈殿の後、TE緩衝液に

溶解し、5'末端がリン酸化されたNot I リンカーをDNAライゲーションキットを用いて連結した。エタノール沈殿を行った後、Not I で完全消化し、アガロースゲル電気泳動を行い約3.7 kbpのDNAを切出し、フェノール抽出にてDNAを回収した。回収したDNAをライゲーションキットにて自己連結した後、コンピテントE. coli (XL1-Blue) を形質転換した。EcoRIで消化されず、Not I で消化されるような目的のプラスミド(p cDL-SR α /NOT)を選択した。

(2) 発現cDNAの挿入

蛋白発現ベクター(p cDL-SR α /NOT)をNot I とKpn I で完全消化し、電気泳動により約3.7 kbpのフラグメントを回収した(フラグメントA)。

cDNA挿入ベクター(p NV11-ST)をNot I とKpn I で完全消化し、電気泳動により約7.8 kbpのフラグメントを回収した(フラグメント13)。フラグメント13の全塩基配列を配列番号6に示す。

この塩基配列およびそこから演繹されるアミノ酸配列をGenBank Release 1.80により検索したところ、塩基配列およびアミノ酸配列とも新規であることが確認された。

フラグメントAとフラグメント13をDNAライゲーションキットを用いて連結した後、コンピテントE. coli (XL1-Blue) を形質転換した。アンピシリン(100 μ g/ml)を含むLBプレート上で培養し生じたコロニーのうち、フラグメント13が挿入されたプラスミドを制限酵素切断により選択した。得られたクローンがp NV11-SRである。

実施例11: COS7細胞でのFc γ BP部分cDNAの発現

(1) 発現cDNA/ベクターの大腸菌からの回収

実施例10で得られたFc γ BP cDNA発現プラスミド(p NV11-SR)にて形質転換した大腸菌を10 mlのLB培地で一晚37℃で振とう培養した。これを500 mlのLB培地に加え、OD₆₀₀が0.8になるまで振とうを続けた。OD₆₀₀が0.8に達したら2.5 mlのクロラムフェニコール溶液

(34 mg/ml)を加え、一晚培養した。菌を遠心分離した後、常法通りアルカリ法にてプラスミドDNAを調製した。塩化セシウムの密度勾配による超遠心分離(90,000 rpm、3時間)を2回行ったのち、TE緩衝液で透析しプラスミドを精製し蛋白発現に用いた。

5 (2) COS7細胞へのトランスフェクション

Fc γ BPの約7.8 kbpの部分cDNAを組み込んだプラスミドベクター(pNV11-SR)をCOS7細胞へ一過性に発現させて、タンパク質の性質を調べるために次の様にトランスフェクションを行った。COS7細胞 2×10^5 個を35mmディッシュに加え、10%FBSを含むRPMI1640培地
10 (0.2%炭酸水素ナトリウム、10ユニット/mlペニシリン、0.01%ストレプトマイシンを含む)で一晩培養した。40-60%コンフルエントになったところで、血清を含まないRPMI1640培地で細胞を2回洗浄した。

10 μ gのpNV11-SRプラスミドを250 μ lのRPMI1640培地に溶解したものと、10 μ lのリポフェクション試薬(Transfectam、
15 Sepracor社製)を250 μ lのRPMI1640培地に溶解したものを混合し、直ちにCOS7細胞上に加える。37℃で6時間培養後、培地を除き、10%血清を含むRPMI1640培地を2ml加え、37℃、5%CO₂で2日間培養した。

(3) 発現タンパク質の確認

20 pNV11-SRをトランスフェクションしたCOS7細胞を培養したディッシュ(ϕ 35mm)を2mlのPBS(-)で2回洗浄した。99.5%エタノールを2ml加え、室温で5分間固定した。2mlのPBS(-)で2回洗浄した。ラムダファージのスクリーニングに用いたFc γ BPに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(K9及びK17)の培養上清1mlをそれぞれ加え、
25 室温で1時間インキュベートした。PBS(-)にて3回洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を結合したヤギ抗マウスIgG(H+L)F(ab')₂フラグメント(Zymed社製)を加え室温で30分間インキュベートした。2mlのPBS(-)で3回洗浄した後、0.036%過酸化水素水溶液と0.1%ジアミノベンチジン/0.1M Tris HCl(pH7.

2) 溶液の1:1を加え、室温にて10分間発色させ、タンパク質の発現する細胞を確認した。一次抗体を加えずに、二次抗体としてHRP結合ヤギ抗マウスIgG (H+L) F(ab')₂フラグメントのみを加えたものを対照として用いた。

- 5 結果を図3に示す。K9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(図3、A)およびK17モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(図3、B)培養上清を加えたものでは、いずれもこれらと特異的に反応する細胞が観察されたが、対照(図3、C)では観察されなかった。

10 実施例12: 組換えタンパク質のヒトIgG結合能の検出と性状

(1) ヒトIgGの結合の確認

- FcγBPの部分cDNAを組み込んだプラスミドpNV11-SRをトランスフェクトしたCOS7細胞(φ35mm dish)をPBS(-)で2回洗浄した。99.5%エタノールを2ml加え室温で5分間固定した。2mlのPBS(-)で2回洗浄した。次に、アフィニティークロマトで精製したヒトIgG画分(Cappel社製)を、10%FBSを含むRPMI1640培地にて10μg/mlの濃度に調製し、その1mlをディッシュに加え室温で1時間インキュベートした。2mlのPBS(-)で3回洗浄した後、HRPを結合させたヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂画分(#109-D36-088、コスモバイオ社製)にて室温で30分間インキュベートした。2mlのPBS(-)で3回洗浄した後、0.036%過酸化水素水溶液と、0.1%ジアミノベンチジン/1.0M Tris HCl (pH7.2)溶液の1:1混液を加え室温にて10分間発色させ、発現タンパク質へのIgGの結合を確認した。

(2) IgGの特異的結合

- 25 pNV11-SRをトランスフェクトしたCOS7細胞(φ35mmディッシュ)を2mlのPBS(-)にて2回洗浄した。99.5%エタノールを2ml加え室温で5分間固定する。2mlのPBS(-)で2回洗浄した。

次に、HRPを結合したアフィニティー精製ヒトIgG画分(#55902、Cappel社製)を10%FBSを含むRPMI1640培地にて10μg/

mlの濃度に調製した(溶液1)。溶液1に対し、次のイムノグロブリン(500 μ g/ml)を拮抗阻害物質として加えた:

- ①クロマトグラフィー精製ヒトIgG画分(#55908, Cappel社製)
- ②クロマトグラフィー精製ヒトIgG Fc画分(#55911, Cappel社製),
- ③クロマトグラフィー精製ヒトIgG F(ab')₂画分(#55910, Cappel社製)、
- ④クロマトグラフィー精製ヒトIgM画分(#55916, Cappel社製)
- ⑤クロマトグラフィー精製ヒト血清IgA(#55906, Cappel社製)
- ⑥クロマトグラフィー精製ヒト分泌型IgA(#55905, Cappel社製)

溶液1に上記①から⑥の各拮抗阻害物質を各々別々に加えた溶液1mlを、細胞を固定したディッシュに加え、室温で1時間インキュベートした。2mlのPBS(-)で3回洗浄した後、0.036%過酸化水素水溶液と、0.1%ジアミノベンチジン/0.1% Tris HCl(pH7.2)溶液の1:1の混液を加え、室温にて10分間発色させ、発現タンパク質へのIgGの結合を検討した。溶液1のみで拮抗阻害物質を何も加えなかったものを対照として用いた。

結果を図4および図5に示す。対照実験である無添加条件では細胞が染色される(図4、A)が、精製ヒトIgG画分(図4、B)と精製ヒトIgG Fc画分(図4、C)を添加すると細胞は染色されなかった。一方、他の添加物IgG F(ab')₂画分(図5、D)やヒトIgM画分(図5、E)、ヒト血清IgA(図5、F)、ヒト分泌型IgA(図5、G)ではHRP結合ヒトIgGの結合を阻害できなかった。このことはヒト抗体の場合IgG Fc部にFc γ BPが特異的に結合することを示している。

25

実施例13: Fc γ BP mRNA発現の組織特異性

Fc γ BPのヒト組織での発現の特異性を調べるために、ノーザンブロッティング解析によりmRNAの発現を調べた。ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓の各組織から精製したポリアデニル化RNA 2 μ gをブロッティ

ングしたナイロン膜 (Human Multiple Northern Blots、#7760-1、Clontech社製) を、実施例2の(4)と同様の条件でプレハイブリダイゼーションを行った後、 $[^{32}\text{P}]$ でラベルしたプローブYを用いてハイブリダイゼーションを行った。洗浄の後、オートラジオグラフィにてバンドの検出を行った。-80℃で2日間オートラジオグラムを行った結果、胎盤において約17kbp付近にバンドを検出できた(図6)が、その他の組織においては陰性であった。したがって、胎盤においてFcγBPのタンパク発現が推定された。

10 実施例14: 3種の異なるプローブによるノーザンブロット解析

実施例2の(3)で得たプローブQとA、および実施例6の(2)で得たプローブYがいずれも同一のmRNAとハイブリダイゼーションすることを確認するために、大腸粘膜上皮細胞から抽出したmRNAのノーザンブロット解析を上記3種のプローブQ、A、Yを用いて行った。

15 大腸粘膜上皮細胞よりAGPC法により抽出した全RNA15μgを4.5μlの滅菌水に溶かした後、2μlの5×MOPS緩衝液、3.5μlのホルムアルデヒド、10μlのホルムアミドと混合し、60℃、15分間熱変性した後、ホルムアルデヒド存在下で1%アガロースゲル上で電気泳動した。電気泳動終了後、RNAをナイロン膜(バイオダイナ、ボール社製)へキャピラリー法にて一晩トランスファーを行った。UV架橋によりRNAをナイロン膜に固定した後、10mlのハイブリダイゼーション溶液(5×SSPE、5×Denhardt's溶液、50%ホルムアミド、0.5% SDS、100μg/ml熱変性サケ精子DNA)中にて42℃、8時間プレハイブリダイゼーションを行った。

次いで3種のプローブA、Q、Yを各々、α $[^{32}\text{P}]$ dCTPを用い、メガプライムラベリングキット(Amersham社製)によって放射性標識した。各プローブ 1×10^8 dpmを各々、5mlのハイブリダイゼーション溶液と共にプレハイブリダイゼーション処理したナイロン膜に加え、密封した後、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜の洗浄は0.2×SSC、0.2% SDSを含む溶液中で、65℃、40分間の洗浄操作を3回繰り返して

た。ナイロン膜を乾燥後、X線フィルムに一晩露光した。

以上の結果、プローブA、Q、Yを用いて推定約17kbpのバンドが1本それぞれ検出され、3種類のプローブが分子量的に同一のmRNAとハイブリダイズすることを確認した(図7)。

5

実施例15:FcγBPをコードするcDNAの塩基配列の決定(2)

IgGFc部結合能をもつタンパク質のアミノ酸配列をコードするcDNAのうち、5'末端から約7.8kbp(7826塩基)までの塩基配列の決定につ

10

いては実施例4および6に記載した。残された塩基配列約8.6kbpの塩基配

(1)cDNAの構造と分類

上記実施例4において、プローブA、BまたはQを用いたハイブリダイゼーショ

ンによるスクリーニングで得られた複数のcDNAクローンを、それぞれ大腸菌

内で増幅した後、プローブA、B、Qを用いてマッピングを行った。その結果、

15

各クローンは3種のプローブの1つまたは複数とハイブリダイズし、cDNA上にA→BまたはB→QまたはQ→Aの順にプローブ相同部位が位置するものであった。

これらの結果から、FcγBPの遺伝子には、プローブA、B、Qのそれぞれ

と相同な配列がA→B→Qの順に連なった単位がタンデムに複数回繰り返した構

20

造を有することが推定された。そこで、プローブBとハイブリダイズするcDNAクローンについて、プローブBの塩基配列の一部(約280塩基対)を次のプライマーを用いてPCRにより増幅させた。

プライマー(P-1):

5'-GCC TGC GTG CCC ATC CAG-3'

25

プライマー(P-2):

5'-CTC ATA GTT GGG CAG GCAC-3'

PCRにより増幅したフラグメントをアガロースゲル電気泳動にて分離後ゲルから回収し、塩基配列を解析した。この塩基配列の違いから、プローブBとハイブリダイズするcDNAクローンを次の3群に分類し、プローブBとハイブリダ

イズしないcDNAクローンを第4群とした。

第1群：クローンV11の増幅フラグメントと同一の配列をもつ群。

第2群：第1群の配列と比較して5塩基の置換があり、フラグメント中にHincII部位を含まない群。

5 第3群：第1群の配列と比較して7塩基の置換があり、フラグメント中にHincII部位を含む群。

第4群：プローブBとハイブリダイズしない群。

(2) クローンT5

3' 末端側のポリA部分をもつcDNAを分離するために、実施例3において
10 オリゴdTプライマーを用いて作製したcDNAライブラリーを、プローブA、
BまたはQを用いて実施例4と同様の方法でスクリーニングを行ったところ、
プローブQのみとハイブリダイズした。得られたcDNAクローンのうち最長のc
DNA挿入部をもつものをクローンT5とした。

クローンT5の挿入cDNAをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動
15 により分離、精製し、プラスミドベクターpBluescript SK (+)
のEcoRI部位に挿入した。この後、T5の制限酵素地図の作製および全塩基
配列の決定を行った。

また、クローンT5挿入部のcDNAのうちで、ポリ(A⁺)から約1キロ塩
基対5'側のBamHI部位と、同じくポリ(A⁺)から約1.6キロ塩基対5
20 '側のPstI部位に挟まれた約550塩基対をプローブVとした。プローブV
はクローンNZ4、C72、Y1、X1、V11、A53、A40およびA31
とはハイブリダイズせず、T5に特異的な配列であった。

(3) クローンA43

プローブA、BまたはQとハイブリダイズするcDNAクローンをプローブV
25 を用いて実施例4の(2)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行い、プロ
ーブAおよびBとはハイブリダイズせず、プローブVおよびQとのみハイブリ
ダイズするクローンを得た。このクローンの挿入cDNAをEcoRIで切断し、
アガロースゲル電気泳動により分離、精製し、プラスミドベクターpBlues
cript SK (+)のEcoRI部位に挿入した。この後、制限酵素地図の

作製および全塩基配列の解析を行った。

塩基配列解析の結果、プローブQとハイブリダイズする部分を含む約2キロ塩基対の部分がT5と重複する部分の配列と一致することを確認した。

(4) クローンA8

- 5 クローンA43より5' 方向に伸長したcDNAを得るため、クローンA43の5' 付近の塩基配列(約240塩基対)を増幅可能な次のプライマーを合成した。

プライマー(P-3) :

5' -TGT TGG GAC GAA TGT CGG-3'

- 10 プライマー(P-4) :

5' -TCA CAG CCA ACC TGT GCC-3'

- 実施例15の(1)において分類した第1群、第2群、第3群のcDNAクローンを上記プライマー(P-3)および(P-4)を用いてPCRを行った。PCRにより増幅したフラグメントをアガロースゲル電気泳動にて分離後回収し、
- 15 塩基配列を解析した。これにより、実施例15の(1)において分類した第3群のcDNAクローンの中で、PCRフラグメントの配列がA43と同一の塩基配列をもつものを選択し、クローンA8とした。クローンA8の全塩基配列を解析し、3' 側の塩基配列がA43の5' 側の重複する配列と完全に一致することを確認した。

- 20 (5) クローンA53およびクローンA40

第2群に属するcDNAクローンのうち、プローブQおよびAとハイブリダイズする部分を5' 側にもつ2つの異なるクローンを制限酵素地図より選択した。このうち、クローンV11の3' 側と重複する部分のより長い方をクローンA53、より短い方をクローンA40とした。

- 25 クローンA53およびクローンA40の全塩基配列を解析し、クローンA53の3' 側とクローンA40の5' 側の重複する部分(約2.4キロ塩基対)の塩基配列が同一であることを確認した。また、V11の3' 側とA53の5' 側の重複する約1.8キロ塩基対を比較したところ、1塩基(第6273塩基; V11ではAであり、A53ではG)を除いてこれらの塩基配列が完全に一致するこ

とを確認した。

(6) クローンA31

クローンA40より3' 方向に伸長したcDNAをスクリーニングするために次の操作を行った。クローンA53およびクローンA40において、プライマー
5 (P-3) およびプライマー(P-4) によって増幅されるフラグメントの塩基配列が第1群のV11の配列と異なり、また第3群のA8の配列とも異なっていたため、この部分の配列を指標に次のスクリーニングを行った。すなわち、全クローン69個のうち第1群と第3群を除くcDNAクローンについてプローブA、
10 BまたはQとハイブリダイズするcDNAクローンを、プライマー(P-3) およびプライマー(P-4) を用いてPCRを行い、増幅したフラグメントの塩基配列を決定した。この塩基配列がクローンA53およびA40と同一であるcDNAクローンを選択した。この中から、PCRの増幅配列を5' 側の端にもち、3' 側に伸長するクローンを選択し、これをクローンA31とした。

クローンA31の全塩基配列を解析した結果、A31の5' 側の配列がクロー
15 ンA40の3' 側の重複する部分と、またA31の3' 側の配列がクローンA8の5' 側の重複する部分の配列と同一であることを確認した。

実施例16: FcγBPをコードするcDNAの塩基配列の決定(3)

FcγBPのcDNAは全長16.4キロ塩基対の中に、3.5キロ塩基対を
20 ユニットとする配列(プローブA、B、Qと相同部分を含む)の3回のタンデムリピートが存在し、それぞれの繰り返し配列が互いに95%以上の相同性を有する構造をしていた(図8)。

このリピート構造内の塩基配列の決定に用いたcDNAは、前述の通り、A、
BまたはQの各プローブと強い反応性を有することでクローニングされてきた。
25 そして各々の塩基配列を比較することにより重複する部分の塩基配列が同一であることを確認して、cDNA同士の連なりを明らかにし、これにより一連のcDNA断片が単一のmRNA(遺伝子)に由来するものであることを明らかにしてきた。この事実を再確認するために、既に発現に用いた5' 末端cDNAを含むpNV11SRとは別のリピート構造内のcDNA断片をタンパク質発現させ、

FcγBPを認識するモノクローナル抗体であるK9およびK17によりこの発現タンパク質断片が認識されるかどうかの検定を行った。

(1) 開始コドンを含むアダプターの合成

ベクターに組み込む各cDNA断片を、その5'部分から全長を発現させるには、cDNAの5'部分に翻訳開始コドン(ATG)を連結させなくてはならない。また、翻訳するタンパク質がFcγBPと同一のフレームで翻訳されるために、開始コドン(ATG)とcDNAの5'端の間でフレームを調節する必要がある。そこで、以下の2つの条件を満足するアダプター用オリゴヌクレオチドを合成した。

10 合成オリゴヌクレオチドは、FcγBPの本来の開始コドン(ATG)を含むpNV11SRの開始領域と同じ7塩基配列(GCCATGG)を含み、Kozak則に合致するものとする。

また、このオリゴヌクレオチドには、ベクターへの挿入が容易となるように、5'端側にHindIII部位を、3'端側にEcoRI部位を付加する。フレームを調節するために、次の3つのオリゴヌクレオチド(FR-1S、FR-2S、FR-3S)を作製した。そして、それぞれのオリゴヌクレオチドと相補的なFR-1A、FR-2A、FR-3Aをも併せて合成した。

アダプター用合成オリゴヌクレオチド

FR-1S: 5'-A GCT TCT GCA GCC ATG GG-3'
20 FR-1A: 3'-AGA CGT CGG TAC CCT TAA-5'
FR-2S: 5'-A GCT TCT GCA GCC ATG GGG-3'
FR-2A: 3'-AGA CGT CGG TAC CCC-5'
FR-3S: 5'-A GCT TCT GCA GCC ATG GGA G-3'
FR-3A: 3'-AGA CGT CGG TAC CCT CTT AA-5'

25 各オリゴヌクレオチドは、DNA合成機(model 1394、ABI社製)を用いて合成した後、精製を行った。

次に、実施例9-(5)と同様の方法にて、FR-1SとFR-1A、FR-2SとFR-2A、FR-3SとFR-3Aを各々アニーリングした後、5'末端のヌクレオチドをリン酸化した。作製した各アダプターをアダプターFR-1、

アダプターFR-2、アダプターFR-3とする。

(2) T AIII/SKベクターの改変

実施例9-(5)により作製したストップコドンを含むベクターpBLS/T AIIIにXba I部位を付加するために以下の操作を行った。

- 5 すなわち、実施例10-(1)と同様の方法で、pBLS/T AIIIを制限酵素Xho Iで完全消化後、末端を平滑化した。末端をリン酸化したXba Iリンカーを連結後、Xba Iで再消化し、自己連結した後、コンピテントE. coliを形質転換する操作により、pBLS/T AIIIのXho I部位にXba I部位が挿入されたベクターpBLS/T AIII2を得た。

- 10 (3) 開始コドンを含むオリゴヌクレオチドの挿入

pBLS/T AIII2をEcoRIとHindIIIで完全消化後、アガロースゲル電気泳動にて約3キロ塩基対のベクター部分を回収した。実施例9-(5)と同様の方法で、アダプターFR-1、FR-2、FR-3を各々、上記pBLS/T AIII2に挿入した。塩基配列を解析し、FR-1、FR-2、FR-3の
15 各アダプターが1つずつ正しく挿入されたプラスミドを得て、各々をFr1-SK2、Fr2-SK2、Fr3-SK2とした。

(4) FcγBP cDNA断片の挿入

cDNAクローンA53をFcγBPと同じフレームで発現させるために、A53のcDNA部分をEcoRIで切り出した後、Fr3-SK2のEcoRI
20 部位に挿入した。cDNAの5'末端がFr3-SK2の開始コドン側にある方向のプラスミドを選択し、これをpiF-A53とする。

同様にクローンA8の挿入cDNAをFr2-SK2に挿入してpiF-A8を得た。

piF-A53とpiF-A8は実施例11-(1)と同様にして精製後、
25 ンバク発現の実験に用いた。

(5) piF-A53およびpiF-A8の発現

実施例11-(2)と同様の方法にて、piF-A53およびpiF-A8をCOS7細胞にトランスフェクションした。2日間培養後、実施例11-(3)と同様の方法でモノクローナル抗体(K9/K17混液)を用いて細胞染色を行

い、一過性に発現したタンパク質を検出した。その結果、p i F-A 5 3 および p i F-A 8 のいずれをトランスフェクトした細胞もモノクローナル抗体による染色が認められ、両 c DNA が K 9 と K 1 7 のいずれかまたは両方により認識されるタンパク質の一部をコードすることが示された（図 9 の A、B 参照）。これより、A 5 3 および A 8 が F c γ B P の全 c DNA 中の反復配列の一部であることが確定された。

実施例 17 : クローン N Z 4 が F c γ B P mRNA の 5' 末端近傍であることの推定 2

- 10 実施例 7 でのプライマーエクステンションの結果より、現在最も 5' 側に存在するクローン N Z 4 の上流およそ 20 塩基内に転写開始部位が存在し、N Z 4 内に存在する 9 番目の A T G が翻訳開始部位である可能性が推定された。そこで、N Z 4 の上流に i n f r a m e の A T G あるいはストップコドンが存在するかどうかを確認する目的で、ゲノム DNA ライブラリーより F c γ B P 遺伝子を単離し、部分塩基配列を決定した。

(1) ゲノム DNA ライブラリー

ライブラリーは市販のヒト白血球由来（ベクター、EMBL 3 S P 6 / T 7 : C L O N T E C H 社製）のものをを用いた。

(2) プローブ

- 20 スクリーニングに用いるプローブとして、c DNA クローン N Z 4 を B a m H I でベクターより切り出したもの、および実施例 7 で用いた合成オリゴヌクレオチド（プライマー 2 : G C T C C A G C C C A G A G T A T C C A C C A G C T C C A T A G G、33 m e r）をそれぞれ α [32 P] d C T P、 γ [32 P] A T P でランダムプライミングによる標識（N Z 4）、あるいは末端標識（プライマー 2）したものを用いた。

(3) スクリーニング

プローブ N Z 4 によるスクリーニングは実施例 3 で述べた c DNA ライブラリーのスクリーニングの方法に準じて行った。合成オリゴヌクレオチドプローブを用いたスクリーニングでは、ハイブリダイゼーション溶液のホルムアミド濃度を

20%とし、また洗浄は0.3×SSC/0.1% SDSを含む溶液中で45℃、30分間の洗浄操作を5回繰り返して行った。

各プローブに対し、およそ100万のライブラリーについてスクリーニングを行い、その結果NZ4プローブについて2つの、また合成オリゴヌクレオチド
5 プローブについて1つの陽性ブランクが得られ、それぞれすべてのブランクが陽性となるまで繰り返してスクリーニングを行った。

(4) λDNAの抽出

各陽性クローンは、宿主大腸菌LE392を用い、実施例2で述べた方法に準じて増殖させ、DNAを抽出した。

10 (5) 部分マッピングとシーケンス

(4)で得た各々のλDNA (GHFc-1, 2, 3)を制限酵素 (Apa I、BamHI、EcoRI、HindIII、KpnI、NcoI、PstI、SacI、ScaI、SmaI、SpeI、SphI、StuI、XbaI、XhoI)で完全消化し、1%アガロースゲル電気泳動後、サザンブロッティングを
15 行った。ナイロンメンブレンへの転写はゲルを0.25N HClに30分間浸し、続いて変性緩衝液 (0.4N NaOH/1.5M NaCl) 中で15分間×2回室温にて振とう放置し、さらに中和緩衝液 (1M NH₄OAc/0.02N NaOH) 中で15分間×2回室温にて振とう放置した。その後、ゲル1枚につきメンブレン2枚へ同時に転写 (bidirectional transfer) した。2枚のメンブレンは各々NZ4プローブおよび合成オリゴヌクレオチドプローブにてハイブリダイゼーションを行った。

GHFc-1, 2 (Apa I、EcoRI、SacI、XhoI) およびGHFc-3 (BamHI、EcoRI、XbaI) の各陽性フラグメントをpBluescriptベクター (TOYOBO社製) にサブクローニングし、一部
25 シーケンス反応を行った。シーケンス反応は実施例6の方法に準じて行った。

(6) 結果

クローンGHFc-1, 2, 3とも部分的なマッピングとシーケンシングの結果、インサートサイズがおよそ15kb (GHFc-1, 2)、13kb (G

HFc-3)のそれぞれ独立したクローンであり、GHFc-1と2は一部重複していた。また、Fc γ BP cDNAの63、64番目に相当する塩基間および1311、1312番目に相当する塩基間にGT/AG則に一致したイントロン(図10参照)が存在しており、また1311番目までのエキソン部分の塩基配列はcDNAのものと完全に一致していた(図11参照)。さらに、cDNAクローンNZ4の5'上流はGHFc-3に含まれていたが、実施例7において記載した推定上の翻訳開始ATGより87塩基、すなわちNZ4(配列番号1)の5'端より79塩基上流にin frameでのストップコドン(TGA)が存在し、その間に他のin frameでのATGは認められなかった。したがって、これらの結果はクローンNZ4に存在する9塩基目からのATGがFc γ BP遺伝子の翻訳開始ATGである可能性を強く支持する。

実施例18: ヒトFc γ BPの構造とIgGFc結合活性機能との相関関係

これまでに得られたFc γ BPのcDNAの全塩基配列より推定されたアミノ酸配列をもつタンパク構造は、約400アミノ酸残基より成るユニットのくり返し
15 配列が合計12回存在し(R1-R12部)、その前後に約450アミノ酸(H部)と約200アミノ酸(T部)のユニークな配列を有するものであった。図12に示すように、R部のくり返しユニットの内、R3、R6、R9は相互に95%以上の相同性を有し、同様にR4、R7、R10の3者、R5、R8、R11の3
20 者もまた95%以上の相同性があった。一方、R1からR5の各ユニットは相互に約40%程度の相同性があった。そこで、これらの蛋白質ドメインの機能を検討するために、cDNA中にいくつかの欠損部位を持たせた変異クローンを分離し、それらをCOS細胞に発現させ、IgG結合活性などの機能を検討した。

Fc結合活性の測定のため、動物細胞に発現させた部分cDNAプラスミドpNV11は図12に示したように、H、R1、R2、R3、R4、R5及びR6の一部の各ユニットで構成されるが、これらのうちどこにFc結合活性が存在する
25 のかを確かめるために、以下の実験を行った。即ち、制限酵素による切断・再結合または、連結するクローンの組合せによりNV11の一部をアミノ酸に対するフレームが合う様に欠除したcDNA断片を、発現ベクターSR α に挿入後、大

腸菌XL1-Bを形質転換した。表1に示したように、NV11より一部を削除した後の配列をDNAの塩基番号で示した。尚、NV11のcDNA部分のうち、タンパク質への翻訳の始まる最初の塩基を1番とし、最後の塩基を7776番とする。

- 5 各cDNA断片を含む発現ベクターを大腸菌より精製した後、実施例11と同様の方法で、COS7細胞に一過性に発現させた後、ヒトIgG Fc部による染色、及びFcγBP特異的モノクローナル抗体K9、K17による染色を行った。

- 更に、IgG Fcの結合に対するモノクローナル抗体の阻害を調べるために、次の染色を行った。cDNAを一過性に発現させたCOS7細胞をエタノールで
10 固定した。熱変性したヒトIgGを1μg/mlとなるように、阻害抗体K9とK17の1つあるいは両方、または抗FcγRⅢ（コントロール抗体）を含むハイブリドーマ培養上清にてそれぞれ希釈し、固定細胞とインキュベートした。室温で1時間放置後、PBS（-）にて洗浄し、HRPを結合した抗ヒトIgG（H+L）抗体F（a b'）₂フラグメントと同様にインキュベートし、変性ヒトIgGの結
15 合を検出した。

- 以下に結果を示す。まず、遺伝子発現産物がIgG Fc結合活性を有するかを検討するために、ヒトIgGを一次抗体とし、二次抗体としてHRP標識抗ヒトIgG抗体を用いた。IgGの結合活性を示すのは、H部の全配列及び、それに加え、少なくとも1つ以上のR部の全領域を含有するクローン（NV11、NX、
20 NZCY、ΔBssH、ΔTth、ΔSp1、ΔBssH/Tth、NXΔBssH、NZCV11）であった。また、IgGの結合活性を示す染色性の強度は、R部の含有数が増加するにつれて強度も増加する傾向にあった。しかし、H部の全部または一部を削除したクローン（ΔHinc、ΔHinc/BssH、V11、X1）及び、R部の一部しかもたないクローン（NZC）ではIgGの結合活性は示さなかった。

25

一方、モノクローナル抗体での遺伝子産物の染色性については、R5配列の全部又は一部をもつクローン（NV11、ΔHinc、ΔBssH、ΔTth、ΔSp1、ΔBssH/Tth、ΔHinc/BssH、NZCV11、V11）ではモノクローナル抗体K9の染色が認められ、また、R3またはR6の全部または一部をもつク

ローン (NZCYとNZCを除く全てのクローン) ではモノクローナル抗体K17の染色が認められた。これらの結果により、H部を欠くクローン (Δ Hinc/BssH, V11, X1) ではFc γ BP特異的抗体で反応する蛋白質が発現產生されているにもかかわらず、IgG結合活性は得られず、H部はR部産物にIgG活性を与えるに必須な機能を有していることが示唆された。また、クローンNZCがIgG活性およびK9/K17染色に対して陰性であることから、R部(R1~R5)はIgGの結合部位に対応することも示唆された。

続いて、モノクローナル抗体K9, K17によるIgG結合の阻害結果を示す。各クローンに対する阻害効果は表1にまとめて示したが、

10 ① R3とR5に加えて、他の1つ以上のR領域を含むクローン (NV11, Δ Tth, NZCV11)では、K9またはK17によりある程度のIgG結合の阻害が認められ、両者を加えたときより強く阻害されたが、完全には阻害されなかった。

② R3に加えて他の1つ以上のR領域を含むクローン (NX) では、K17によりある程度のIgG結合の阻害が認められたが、完全には阻害されなかった。また、K9によっては全く阻害されなかった。

③ R3領域のみを含むクローン (NX Δ BssH) では、K17により結合が完全に阻害されたが、K9は影響しなかった。

④ R5領域のみを含むクローン (Δ BssH/Tth) ではK9により結合が完全20に阻害されたがK17は影響しなかった。

⑤ R3及びR5領域を両方とも含まないクローン (NZCY) では、K9, K17ともIgGの結合を全く阻害しなかった。

⑥ 全てのクローンにおいて、コントロール抗体の抗Fc γ R III抗体によるIgG結合の阻害はみられなかった。

25 以上の事より、IgG Fcの結合部位は、R3領域及びR5領域を含めてR1~R5領域に存在し、それぞれのR領域が独立でIgGを結合する事が可能である事が推定された。また、NV11等R領域を複数含むcDNAクローンでは複数のIgGを結合する可能性をもつ事が示された。これらの事実は、アミノ酸配列の相同性から、R1~R12がいずれもIgG結合部位を持ち得ることを推定

させる。

表 1

発 現 テ ー ブ ル

| クローン名 | 塩基番号 (始め～終わり) | モノクロ抗体の結合性 | | 抗体なし | IgGの結合 | | |
|------------|------------------------------|------------|-----|------|--------|------|---------|
| | | K9 | K17 | | +K9 | +K17 | +K9+K17 |
| NV11 | 1~7776 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | + |
| NX | 1~4692 | - | +++ | ++ | ++ | + | + |
| NZCY | 1~3013 | - | - | + | + | + | + |
| NZC | 1~1473 | - | - | - | | | |
| △Hinc | 1~271, 1657~7776 | +++ | +++ | - | | | |
| △BssH | 1~1600, 2761~7776 | +++ | +++ | ++ | | | |
| △Tth | 1~3272, 5477~7776 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | + |
| △Spl | 1~6066 | +++ | +++ | + | | | |
| △BssH/Tth | 1~1600, 2761~3272, 5477~7776 | +++ | +++ | ++ | - | ++ | - |
| NX△BssH | 1~1600, 2761~4692 | - | +++ | + | + | - | - |
| △Hinc/BssH | 1~271, 2761~7776 | +++ | +++ | - | ++ | ++ | + |
| NZCV11 | 1~1473, 4165~7776 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | + |
| V11 | 4165~7776 | - | +++ | - | | | |
| X1 | 1445~4692 | - | +++ | - | | | |

実施例 19 : Fc γ BP ゲノム遺伝子の部分解析 (転写開始部位の確定)

実施例 7 でのプライマーエクステンションの結果より、現在最も 5' 側に存在するクローン NZ 4 の上流およそ 20 塩基内に転写開始部位が存在し、NZ 4 内に存在する 9 番目の ATG が翻訳開始部位である可能性が推定されたが、その NZ 4 の上流に in frame の ATG あるいはストップコドンが存在するかどうかを確認する目的でゲノム DNA ライブラリーより Fc γ BP 遺伝子を単離し、部分塩基配列を決定した。

また、S1 マッピングを行い、より正確な転写開始部位の決定を行った。

(1) ゲノム DNA ライブラリー

- 10 ライブラリーは市販のヒト白血球由来 (ベクター、EMBL 3 SP 6 / T7 : CLONTECH 社) のものを用いた。

(2) プローブ

- スクリーニングに用いるプローブとして cDNA クローン NZ 4 を BamH I でベクターより切り出したもの、および実施例 7 で用いた合成オリゴヌクレオチド (プライマー 2 : GCTCCAGCCCAGAGTATCCACCAGCTCCATAGG, 33mer)
15 をそれぞれ α [32 P] dCTP、 γ [32 P] ATP でランダムプライミングによる標識 (NZ 4)、あるいは末端標識 (オリゴヌクレオチド) したものを
 を用いた。

(3) スクリーニング

- 20 プローブ NZ 4 によるスクリーニングは実施例 4 で述べた cDNA ライブラリーのスクリーニングの方法に準じて行った。合成オリゴヌクレオチドプローブを用いたスクリーニングでは、ハイブリダイゼーション溶液のホルムアミド濃度を 20% とし、また Washing は 0.3 x SSC / 0.1% SDS を含む溶液中で 45°C、30 分間の洗浄操作を 5 回繰り返して行った。
25 各プローブに対し、およそ 100 万のライブラリーについてスクリーニングを行い、その結果 NZ 4 プローブについて 2 つの、また合成オリゴヌクレオチドプローブについて 1 つの陽性ブランクが得られ、それぞれすべてのブランクが陽性となるまで繰り返しスクリーニングを行った。

(4) λ DNA の抽出

各陽性クローンは、宿主大腸菌 L E 3 9 2 を用い、実施例 2 で述べた方法に準じて増殖させ、DNA を抽出した。

(5) 部分マッピングとシーケンス

4 で得た各々の λ DNA (GHFc-1, 2, 3) を制限酵素 (ApaI, BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, NcoI, PstI, SacI, ScaI, SmaI, SpeI, SphI, StuI, XbaI, XhoI) で完全消化し、1% アガロースゲル電気泳動後、サザンブロッティングを行った。ナイロンメンブレンへの転写はゲルを 0.25N HCl, 0.4N NaOH/1.5M NaCl, 1M NH_4Ac /0.02N NaOH でそれぞれ 15 分、2 回処理した後、ゲル 1 枚につきメンブレン 2 枚へ同時に転写 (bidirectional transfer) した。2 枚のメンブレンは各々 NZ4 プロブおよび合成オリゴヌクレオチドプロブにてハイブリダイゼーションを行った。

GHFc-1, 2 (ApaI, EcoRI, SacI, XhoI) および GHFc-3 (BamHI, EcoRI, XhoI) の各陽性フラグメントを pBluescript ベクター (TOYOBO 社) にサブクローニングし、一部シーケンス反応を行った。シーケンス反応は実施例 6 の方法に準じて行った。

(6) S1 マッピング

S1 プロブ作製用テンプレートとして、クローン GHFc-3 の EcoRI/SacI 断片 (cDNA クローン NZ4 の上流約 2kb に相当) を pBluescriptSK⁺ にサブクローニングした後、ヘルパーファージ VCSM13 により調製した ssDNA を用いた。このテンプレートにプライマーエクステンションで用いたラベルされたプライマー 2 をアニールし、BcaBEST ポリメラーゼ (TAKARA) により 65℃、10 分間合成を行った。これを BamHI 消化し、熱変性後 8M 尿素を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルにて分離し目的とするバンドを切り出した。切り出したゲルは G 緩衝液 (1M NH_4OAc /20mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ /0.1M EDTA/0.2% SDS/10ug/ml yeast tRNA) 中、37℃ で一晩インキュベートしてプロブを溶出した。この S1 プロブ (1×10^5 cpm) をヒト大腸上皮由来全 RNA (40 μ g) と polyA⁺RNA (1.5 μ g) を混合し、エタノール沈澱後それぞれ 20 μ l の S1 ハイブリダイゼーション液 (80% ホルムアミド/40mM PIPES/400mM NaCl/1mM EDTA) に溶解した。これを 80℃ で 10 分処理した後、42℃ で一晩ハイブリダイゼー

ションを行った。これに200 μ lのS1溶液(30mM NaOAc (pH4.6) /280mM NaCl /1mM ZnSO₄ /1mg/ml ssDNA /150unit S1ヌクレアーゼ)を加え37°C 40分間消化した。これを6%のシークエンスゲルにて泳動しゲルは固定、乾燥後、オートラジオグラフィーを行った。

5 結果と考察

クローンGHFc-1, 2, 3とも部分的なマッピングとシークエンシングの結果、インサートサイズがおおよそ15kbp (GHFc1, 2), 13Kbp (GHFc3)のそれぞれ独立したクローンでありGHFc1と2は一部 overlapしていた。また、Fc γ BPcDNAの63、64番目に相当する塩基間および1311, 1312番目に相当する塩基間にGT/AG則
10 に一致したイントロンが存在しており1311番目までのエキソン部分の塩基配列はcDNAのものと完全に一致していた(図10, 11参照)。さらに、cDNAクローンNZ4の5'上流はGHFc3に含まれており、推定上の翻訳開始ATGより87base, NZ4の5'端より79base上流にin frameでのストップコドン(TGA)が存在し、その間に他のin frameでのATGは認められなかった。従って、これら
15 の結果はクローン NZ4に存在する9番目のATGがFc γ BP遺伝子の翻訳開始ATGである可能性を強く支持するものである。また、NZ4の5'上流おおよそ2kbp内にTATA/CCAAT等の典型的なプロモーターモチーフは含まれていなかった。さらに、S1マッピングの結果から、このATGより8, 9, 10塩基上流に相当する長さのバンドが見られ、その内10のA残基でもっともそのシグナルが
20 強いことから、このA残基より転写が開始するものと考えられた。

実施例20: Fc γ BP遺伝子多型の解析

Fc γ BP cDNAのシークエンスの結果、コーディング領域内の特定部位に遺伝子多型の存在が示唆された。すなわちFc γ BP cDNAの5120, 8723, 12326
25 番目に存在するSmaI部位についてクローンA52の同領域ではCCCGGGからCCTGGGへの塩基の置換が認められた。cDNAクローニングに用いたライブラリーは単一
個体由来ではなく数人の遺伝子をその由来とするために、この塩基置換が個体間で認められるものかあるいは同一個体において半数体ゲノムあたり存在する主要な3回の繰り返し領域間に認められるものかどうかを確認するために以下の実験

を行った。

Forward側プライマーとして

BC1:ACCACTCCTTCGATGGCC,

GS1:ACCTGTAACATATGTGCTGGC, の2種、

5 Reverse側プライマーとして

GS2:TGGTGGTGACGGTGAAGGG,

GS3:ACAGCAGGGTTGCCCCGG,

GS4:TGGTGCCGAGGGCAGCCACG,

BC2:TGGGTCACTGAAATCCG, の4種を合成した。

10 また6名の健常人白血球並びに4名の担癌患者大腸の正常部位より上皮細胞を分離後、Nelson等の方法によりDNAを抽出した。各DNA20ngにプライマーセットBC1/BC2, BC1/GS3, BC1/GS4, GS1/GS3, GS1/GS4を終濃度20pmoleで加え、PCR緩衝液(10mM Tris HCl pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200μM dNTPs, 0.001% gelatin, 2.5unit taqポリメラーゼ)中、(94°C 1min-60°C 1.5 min -
15 72°C 2.5 min x 30サイクル)の条件でPCRを行った。PCR産物はSmaI消化後2%アガロースゲルにて泳動し、EtBrにて染色を行った。

以上の結果、各プライマーセットに対するPCR産物をSmaI処理することによりプライマーBC1/BC2を除いた各セットで遺伝子多型が存在することが明らかとなった。

20 すなわち、10種のDNA標品の内、1つはSmaIにて完全消化されることからこのサンプルは少なくとも対立遺伝子を含めた6カ所の繰り返し部位すべてにSmaI部位が存在し、他のサンプルではSmaIでの消化、未消化産物の割合が各種の頻度で観察された。逆に、これら10サンプルの内SmaIサイトをも全くもたないものは存在しなかった。また、HT-29N2細胞において同じプライマーセットを用
25 いてRT-PCRした後、SmaIにて消化したところ、全てそのサイトを含んでいた。

また、プライマーBC1/BC2で多型が認められなかった理由としてPCR産物の鎖長が約1.8kbpあることからプライマーGS4とプライマーBC2の間におよそ1.6kbpのイントロンが存在し、このイントロンの5'側にSmaI部位が存在することが示

唆された。この部位と多型を示す目的のSmaI部位間の長さが非常に短く、BC1/B C2での増幅産物とそのSmaI消化産物との鎖長差が僅かであるために多型が検出されなかったものと推定された。

5 実施例 21 : 誘導型高発現 CHO 細胞株の分離と Fc γ BP の検出

実施例 11 で示した Fc γ BP フラグメントを多量に、安定して発現する細胞株を樹立する目的で、動物細胞用発現ベクター、pMSXND を用いて Fc γ BP 部分 cDNA、NV11ST を発現させた。pMSXND ベクターは蛋白発現の誘導がナトリウムブチレートなどにより可能なメタロチオネインプロモーターを発現プロモーターとして有し、染色体 DNA に組み込まれた後に遺伝子増幅を可能にする dhfr 遺伝子をもつ様構築されている。

(1) pMSXND ベクターの改変

まず、pMSXND の cDNA クローニング部位である XhoI にてプラスミドを完全消化した後、0.4 単位の Klenow Fragment にて 15 分間処理し、末端を平滑化した。

次に、NotI リンカー (5'-pGCGGCCGC-3') をベクターにライゲーションした後 NotI で完全消化し、自己連結させてからコンピテント E. coli XL1-B を形質転換した。得られたクローンを解析し、pMSXND の XhoI 部位に NotI リンカーが挿入されたプラスミド pMSXND-NOT を得た。

20 (2) cDNA の挿入

pMSXND-NOT を NotI で完全消化した後、アルカリフォスファターゼ処理により脱リン酸化を行った。次に、実施例 6-(6) で作製した Fc γ BP cDNA を組み込んだプラスミドである pNV11-ST を NotI で完全消化し、アガロースゲル電気泳動にて 8 kbp の cDNA 部分を分離、回収した。これらの発現ベクターと cDNA 挿入部分をライゲーションし、コンピテント E. coli (XL1-B) を形質転換した。アンピシリンを含む LB プレート上で培養し生じたコロニーのうち、メタロチオネインプロモーターに対しセンスの方向で cDNA が挿入されたプラスミドを選択し、pNV11-MSX を得た。

(3) CHO 細胞での IgG FcBP 部分 cDNA の発現

実施例 11 と同様の方法にて pNV11-MSX プラスミドを含む大腸菌を培養し、増幅したプラスミドを精製した。このプラスミド 10 μ g を 250 μ l の F-12 培地（ヌクレオチド添加）に溶解したものと、10 μ l のリポフェクション試薬（Transfectum, SEPRACOR 社）を 250 μ l に溶解したものを混合し、直ちに CHO 細胞（dhfr 欠損株）5 上加えた。37°C で 6 時間培養後、10% 血清を含む F-12 培地で置換し 3 日間培養した。次に、培地を 1 mg/ml の G418、10% 牛胎児血清を含む α -MEM 培地（ヌクレオチド不含、GIBCO 社製）に置換し、3 日毎に培地交換しながら 14 日間培養し、プラスミドの挿入された細胞を選択した。このようにして数十個のコロニーを形成したディッシュより、限界希釈法にて細胞をクローニングした。得られた細胞クローンのうち Fc 結合活性の高い蛋白発現を示すものを選択し、より多くの発現量を得るために次に遺伝子増幅を行った。

（4） 遺伝子増幅

pNV11-MSX が CHO 細胞の染色体に組み込まれ、安定に Fc γ B P フラグメントを発現する細胞クローンの蛋白質産生量を増加させるために、メトトレキセート処理によって組み込み遺伝子の増幅を行った。15

即ち、前記の安定発現細胞クローンを、0.005 μ M のメトトレキセート、500 μ g/ml の G418 含む α -MEM 培地（ヌクレオチド不含）にて 3-4 週間培養し、生育する細胞を選択した。次に、メトトレキセート濃度を 4 倍（0.02 μ M）に増加し、同様の方法で 3-4 週間培養した。メトトレキセート濃度を 4 倍に増加させ培養する操作をくり返し、最終的に 6.4 μ M~25 μ M のメトトレキセート存在下で増殖する細胞を得た。この細胞を限界希釈法にてクローニングを行い、Fc γ B P フラグメントを高発現する細胞株を得た。発現量の増加は、実施例 11 および 12 における同様に、K9/K17 モノクローナル抗体による組織化学的染色または IgG 結合能の検出法による第一次的判定によった。

25 （5） 細胞試料の作製

Fc γ B P フラグメントを安定的に高発現する CHO 細胞株 5 \times 10⁵ 細胞を ϕ 100 mm ディッシュに移し、6.4 μ M メトトレキセート、1 mg/ml G418 を加えた α -MEM 培地にて培養した。必要に応じて終濃度 5 mM となるようナトリウムブチレートを追加し、蛋白質の発現誘導を行った。3 日後に、培養上清（SUP1）を採取し、

さらにSUP 1から細胞片を除くため100,000xg、60分間遠心後、上清(SUP 2)を回収した。細胞は、500 μ lの細胞溶解緩衝液(50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 10mM monoiodo acetamide, 10 μ g/ml aprotin ine, 10 μ g/ml leupeptin)に懸濁後、超音波処理(30秒 \times 3回)を行い、10,000xg、10分間4 $^{\circ}$ Cの遠心を行った。遠心後の上清(LYS 1)を除き、残渣に、1%NP-40を含む細胞溶解緩衝液400 μ lを加え、超音波処理後、遠心し上清を回収した(LYS 2)。更にこの残渣に1%NP-40, 0.1%SDS, 0.5%デオキシコール酸ナトリウムを含む細胞溶解緩衝液200 μ lに溶解後、遠心し上清を回収した(LYS 3)。残渣は100 μ lの細胞溶解緩衝液に懸濁した(LYS 4)。また、コントロールとして大腸上皮細胞の溶解液(1/100 \sim 1/3200希釈)を用いた。

(6) サンドイッチELISA

産生されたFc γ B Pフラグメントを定量的に検出するために、Fc γ B Pに対する特異的モノクローナル抗体K 9およびK 17を用いたサンドイッチELISA系の開発を行った。アフィニティー精製したK 9抗体を5 μ g/mlとなるよう0.05M炭酸緩衝液(pH9.2)にて調製し、50 μ l/ウェルでELISAプレート(PRO-BIND, フェルコン社製)に加えた後、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。ウェルを洗浄溶液(0.05%Tween-20を含むPBS(-))で3回洗浄した後、ブロッキング溶液(10%血清を含むRPMI 1640培地)を50 μ l/ウェル加え、温室で60分間放置した。

ブロッキング溶液を除き、(5)にて調製した試料を各々50 μ l加え、室温2時間放置した。洗浄溶液にて3回洗浄し、ブロッキング溶液にて4mg/mlに希釈したHRP結合K 17抗体を50 μ l加え、室温1時間放置した。洗浄溶液にて3回洗浄後、50 μ lの発色液(20mg 0-phenylenediamine, 80 μ l H₂O₂(30%)を50mlのクエン酸緩衝液に溶解)を加え、室温で3分間発色させた。50 μ lの2.5M H₂SO₄溶液を加え反応を停止してから492nmの吸光度を測定した。

〔結果〕

(i) 得られた代表的なFc γ B P発現CHO細胞株について

メトトレキセート存在下で培養後、ナトリウムブチレート処理後および未処理

後3日目におけるFc γ B Pフラグメントの発現量をK9/K17モノクローナル抗体による細胞染色法により検出した。図13に示すように、高発現株が分離できた。

(ii) ELISAによるFc γ B Pフラグメントの定量結果

- 5 Fc γ B Pフラグメントの安定高発現株から調製された各試料をサンドイッチELISA法にて測定した結果、次の表2の吸光度が示す様に、Fc γ B Pフラグメントは細胞溶解液中(LYS1~4)に比べて、培養上清中(SUP1, 2)により多く検出された。この事実は発現させたFc γ B Pフラグメントは細胞内に蓄積するのではなく細胞外に分泌されることを示している。

表 2

| 試 料 | | OD ₄₉₂ |
|-----------------------|----------|-------------------|
| 大腸上皮細胞溶解液 (コントロール) | 1/100 希釈 | 2.184 |
| | 1/200 | 2.024 |
| | 1/400 | 1.516 |
| | 1/800 | 0.935 |
| | 1/1600 | 0.514 |
| | 1/3200 | 0.264 |
| 発現誘導細胞 | SUP1 | 0.731 |
| | SUP2 | 0.712 |
| | LYS1 | 0.044 |
| | LYS2 | 0.174 |
| | LYS3 | 0.013 |
| | LYS4 | 0.095 |
| 発現非誘導細胞 | SUP1 | 0.259 |
| | SUP2 | 0.273 |
| | LYS1 | 0.027 |
| | LYS2 | 0.070 |
| | LYS3 | 0.012 |
| | LYS4 | 0.019 |

【配列表】

【配列番号 1】

配列番号：1

配列の長さ：908

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

配列

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CTGCAGCCAT | GGGTGCCCTA | TGGAGCTGGT | GGATACTCTG | GGCTGGAGCA | 50 |
| ACCCCTCTGT | GGGGATTGAC | CCAGGAGGCT | TCAGTGGACC | TCAGAPACAC | 100 |
| TGGCAGAGAG | GAATTCCTCA | CAGCCTTCCT | GCAGAACTAT | CAGCTGGCCT | 150 |
| ACAGCAAGGC | CTACCCCGGC | CTCCTTATCT | CCAGTCTGTC | AGAGAGCCCC | 200 |
| GCTTCAGTCT | CCATCCTCAG | CCAGGCAGAC | AACACCTCAA | ACAAGGTGAC | 250 |
| AGTGAGGCCC | GGGAGTCGG | TCATGGTCAA | CTCAGTGCC | AAGGCTGAGA | 300 |
| TGATAGGCAG | CAAGATCTTC | CAGCATGCCG | TGGTGATCCA | TTCTGACTAT | 350 |
| GCCATCTCTG | TGCAGGCACT | AAATGCCAAG | CCTGACACAG | CGGAGCTGAC | 400 |
| ACTGCTGGGG | CCCATCCAGG | CCCTAGGCAC | CGAGTATTTT | GTGCTCACAC | 450 |
| CCCCCGGAC | CTCAGCCAGG | AATGTCAAGG | AGTTTGGCGT | GSTGGCCGGT | 500 |
| GGCGCAGGTG | CCTCGGTGAG | TGTACCGGTG | AAGGGGTGAG | TGACATTCAA | 550 |
| TGSCAPAGTTC | TTTCCAGGAG | GCGATGTCTT | AAGAGTGACT | CTACAGCCCT | 600 |
| ACATATGTGGC | CCAGCTACAG | AGCTCAGTGG | ATCTCTGGGG | GTCAPAGGTC | 650 |
| ACAGTAGTGA | GCCCCGTGGC | TGTCCTCTCT | GCCACAGCT | GTCGGCAGAA | 700 |
| ACATACGACC | TGCAACCATG | TGGTGGAGCA | GCTGCTACCC | ACGTCTGCCT | 750 |
| GGGSCACCCA | CTATGTAGTA | CCACCGCTGG | CCTCCCAATC | TGCTATGAT | 800 |
| TTGGCCTTCG | TTGTGGCCAG | CCAGGCCACA | AAGCTGACCT | ACAACCATGG | 850 |
| GGGATCACT | GGCTCCCGTG | GGCTCCAGGC | AGGTGATGTG | GTAGAGTTTG | 900 |
| AGGTCCGG | | | | | 908 |

【配列番号2】

配列番号：2

配列の長さ：1336

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

配列

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GGCCTACACC | AAGGCCTACC | CCCGCCTCCT | TATCTCCAGT | CTGTCAGAGA | 50 |
| GCCCCGCTTC | AGTCTCCATC | CTCAGCCAGG | CAACACACAC | CTCPAAGPAG | 100 |
| GTCACTAGTA | GGCCCGGGGA | GTCGGTCATG | GTCAACATCA | GTGCCAAGGC | 150 |
| TGAGATGATA | GGCAGCAAGA | TCTTCCAGCA | TGCGGTGGTG | ATCCATTCTG | 200 |
| ACTATGCCAT | CTCTGTGCAG | GCACTAAPTG | CCPAGCCTGA | CACAGCGGAG | 250 |
| CTGCACTGCG | TGCGGCCCAT | CCAGGCCCTA | GGCACCGAGT | ATTTTGTGCT | 300 |
| CACACCCCCC | GGCACCTCAG | CCAGCAATGT | CAAGCAATTT | GCCGTGGTGG | 350 |
| CCGGTGCCCG | AGGTGCCTCG | GTCAGTGTCA | CGCTGAAGGG | GTCAGTGACA | 400 |
| TTCAATGGCA | AGTTCATATC | AGCAGGCGAT | GTCTTAAGAG | TGACTCTACA | 450 |
| GCCCTACAPT | GTGGCCCCAG | TACAGAGCTC | AGTGGATCTC | TGCGGGTCAA | 500 |
| AGGTACACAG | TAGTAGCCCC | GTGGCTGTCC | TCTCTGGCCA | CAGCTGTGGG | 550 |
| CAGAAACATA | CGACCTGCPA | CCATGTGGTT | GAGCACTGTC | TACCCACGTC | 600 |
| TGCCTGGGCG | ACCCACTATG | TAGTACCCAC | GCTGGCCTCC | CAATCTCGCT | 650 |
| ATGATTTGGC | CTTCGTTGTG | GCCAGCCAGG | CCACAAAGCT | GACCTACAAC | 700 |
| CATGGGGGTA | TCACTGGCTC | CCGTGGGCTC | CAGGCAGGTG | ATGTGGTAGA | 750 |
| GTTTGAGGTC | CGGCCATCCT | GCCCACTCTA | CCTGTCTGCA | AATGTGGGCA | 800 |
| TCCAGGTCTT | GTTGTTTGGC | ACAGGTGCCA | TAGGAATGA | AGTGACTTAT | 850 |
| CACCCCCTACC | TGGTCTGTAT | CCCAGATGTG | GCGGCCTACT | GCCCAGCCTA | 900 |
| TGTGGTCTAG | AGTGTACCPG | GCTGTGAGGG | CGTGGCCCTG | GTAGTGGCAC | 950 |
| AGACCPAGGC | TATCAGGGGG | CTGACCATAG | ATGGGCATGC | AGTGGGGGGC | 1000 |
| AAGCTCACCT | GGGAGGCTGT | GCCAGGCAGT | GAGTCTCGT | ATGCTGAAGT | 1050 |
| GGAGCTCGGC | ACAGCTGACA | TGATCCACAC | GGCCGAGGCG | ACCACCAACT | 1100 |
| TGGGACTGCT | CACCTTCGGG | CTGGCCPAGG | CTATAGGCTA | CGCAACAGCT | 1150 |
| GCTGATTGGG | GCCGGACTGT | ACTGTCCCCA | GTGGAGCCCT | CCTGCCAAGG | 1200 |
| CATGCAGTGC | GCAGCCGGGC | AGCGGTGCCA | GGTGGTAGGC | GGGAAGCCCG | 1250 |
| GGTGTGTGGC | GGAGTCCACC | GCTGTCTGCC | GCGCCAGGG | CGACCCCAT | 1300 |
| TACACCACCT | TCCACGGCCG | TCCGTACGAC | ATGATG | | 1336 |

【配列番号 3】

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 8 7 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA

配列

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CCAAGCTCAC | CTGGGAGGCT | GTGCCAGGCA | GTGAGTTCCT | GTATGCTGAA | 50 |
| GTGGAGCTCG | GCACAGCTGA | CATGATCCAC | ACGGCCGAGG | CCACCACCA | 100 |
| CTTGGGACTG | CTCACCTTCG | GGCTGGCCAA | GGCTATAGGC | TACGCAACAG | 150 |
| CTGCTGATTG | CGGCCGGACT | GTACTGTCCC | CAGTGGAGCC | CTCCTGCGAA | 200 |
| GGCATGCACT | GGGAGGCGG | GCAGCGCTGC | CAGGTGGTAG | GCGGGAAGGC | 250 |
| CGGGTGTGTG | CGGAGTCCA | CCGCTGTCTG | CCGGCCCGAG | GCGGACCCCC | 300 |
| ATTACACCAC | CTTCGACGGC | CGTCGGCTAG | ACATGATGGG | CACCTGTTCG | 350 |
| TACACGATGG | TGGACCTGTG | CAGCGAGGAC | GACACCCCTG | CGGCTTTCAG | 400 |
| CGTGGAGGCC | AAGAACGAG | ACCGGGGCGAG | CGGCCGCGTC | TCTACGTGG | 450 |
| GGCTCGTCAC | TGTGGCGGCC | TACAGCCACT | CTGTGTGGCT | GACCCGCGGT | 500 |
| GAAGTGGCT | TGCTCCTGGT | TGACCAACCAG | CGCTCGCGCC | TGCCAGTCTC | 550 |
| CCTGAGTGAG | GGTCGGCTGC | GTGTGTACCA | GAGCGGACCA | CGGGCGGTGG | 600 |
| TGGAGCTGGT | CTTGGGGCTG | GTGGTCACTT | ATGACTGGGA | CTGCCAGCTG | 650 |
| GCATCTAGCC | TGCTGACAG | CTTCCAGAC | CAGGTGTGGG | GGTGTGTGG | 700 |
| CAACTATAAT | GGTGAACAG | CAGACGACTT | CCTCAGGCT | GACGGGGCTC | 750 |
| TGGGTCCTGA | CGCTGTGGAG | TTCGCAAGTA | GTTGCAAGCT | GGATGATGGG | 800 |
| GACTACCTGT | GTGAGGATGG | CTGCCAGAAC | AACGTGTCCG | CCTGTACCCC | 850 |
| AGGCCAGGCC | CAACACTATG | AGGGCGACCG | ACTCTGTGGC | ATGCTGACCA | 900 |
| AGCTCGATGG | CCCTTGGCT | GTCTGCCATG | ACACCTTGA | CCCCAGGCCC | 950 |
| TTCCTGGAGC | AGTGTGTATA | TGACCTGTGT | GTGGTGGGTG | GGGAGCGGCT | 1000 |
| CAGCCTGTGC | CGTGGCCTCA | GCGCCTATGC | CCAGGCTGTG | CTGAGGCTTG | 1050 |
| GCATCTCGGT | TGGGGACTGG | AGATCAACAG | CCACTTGGCC | CCTGTCTCTG | 1100 |
| CCTGCCAACA | GCCGCTATGA | GCTCTGGGGC | CCTGCTTGCC | CGACCTCTCTG | 1150 |
| CAACGGGGCT | GCGGCGCGGT | CCACTGTCTC | CGGGCGGCCC | TGGGTGGAGG | 1200 |
| GCTGGCTGTG | CCTCCAGGC | TTCGTGGCCA | GCGGCGGGCC | CTGGGTGGCG | 1250 |
| GGCTCGTCTG | GTGGCTGCAG | CTTCCAGGGT | CTCCAGCTCG | CTCCGGGCCA | 1300 |
| GGAGTGTGG | GCGGACGAGT | TGTGCCAAAG | GCGCTGCACC | TGCAACGGCG | 1350 |
| CCACCCATCA | GGTCACCTGC | CGCGACAAGC | AGAGCTGCCC | GCGGGGTGAG | 1400 |
| CGGTGCAGCG | TCCAGAACGG | CCTCCTGGGC | TGCTACCCCG | ATCGCTTCGG | 1450 |
| GACCTGCCAG | GGGTCCGGGG | ACCCACACTA | TGTGAGCTTC | GACGGCCGGC | 1500 |
| GCTTCGACTT | CATGGGCACC | TGCACGTACC | TGCTGGTCCG | CTCATGGGGC | 1550 |
| CAGAACGCG | CGCTGCCCTG | CTTCCGGGTG | CTGGTGGAPA | ACGAGCATCG | 1600 |
| GGGAGGCGAG | ACTGTGAGCT | ACACGGCGCC | CGTCCGGGTG | GAGGGCCGGG | 1650 |
| GGGTGAGGT | GGCCGTGCGC | CGGGAGTACC | CCGGGCAAGT | GCTGGTGGAT | 1700 |
| GACGTCTTTC | AGTATCTGCC | CTTCCAGCA | GCAGATGGGC | AGGTGCAAGT | 1750 |
| GTTCGGACAG | GCGAGGGATG | CGTCTGTGCG | CACGGACTTT | GCCCTGACTG | 1800 |
| TCACATAIGA | CTGGAATGCA | CGAGTGAAGT | CCAGGTGCC | CAGCAGCTAT | 1850 |
| GCTGAGGCCC | TGTGTGCACT | CTGTGGGA | | | 1878 |

【配列番号 4】

配列番号： 4

配列の長さ： 3 2 4 7

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直線状

配列の種類： cDNA

配列

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CTTCGACGGC | CGTCGCTACG | ACATGATGGG | CACCTGTTCG | TACACGATGG | 50 |
| TGGAGCTGTG | CAGCGAGGAC | GACACCTTGC | CCGCCCTTCAG | CGTGGAGGCC | 100 |
| AAGAACCAGC | ACCGGGGCGAG | CCGCCCGGTC | TCCTACGTGG | GCCTCGTCAC | 150 |
| TGTGGCGGCC | TACAGCCACT | CTGTGTGGCT | GACCCGCGGT | GAAGTTGGCT | 200 |
| TGGTCTGGT | TGACAACCAG | CGCTCCGGCC | TGCCAGTCTC | CCTGAGTGAG | 250 |
| GGTGGCCTGC | GTGTGTACCA | GAGCGGACCA | CGGGCCGTGG | TGGAGCTGGT | 300 |
| CTTTGGGGTG | GTGGTCACTT | ATGACTGGGA | CTGCCAGCTG | GCACTCAGCC | 350 |
| TGGCTGCACG | CTTCCAGAC | CAGGTGTGGC | GGCTGTGTGG | CAACTATAAT | 400 |
| GGTGAACCCAG | CAGAGCACTT | CCTCAAGGCT | GACGGGGGTC | TGGCTCCTGA | 450 |
| CGGTGTGGAG | TTGGCAAGTA | GCTGGAGGCT | GATGATGGG | GACTACCTGT | 500 |
| GTGAGGATGG | CTGCCAGAAC | AAGTGTCCCG | CCTGCACCCC | AGGTCAGGCC | 550 |
| CAACACTATG | AGGGCGACCG | ACTCTGTGGC | ATGCTGACCA | AGCTCGATGG | 600 |
| CCCTTCGGCT | GTCTGCCATG | ACACCTGGGA | CCCCAGGGCC | TTCTGGAGC | 650 |
| AGTGTGTATA | TGACCTGTGT | GTGGTGGGTG | GGGAGCGGCT | CAGCCTGTGC | 700 |
| CGTGGCCTCA | GCGCCTATGC | CCAGGCGGTG | CTGGAGCTTG | GCACTCTCGT | 750 |
| TGGGGACTGG | AGATCACCAG | CCAACTGCCC | CCTGTCTCTG | CCTGCCAACA | 800 |
| GCGGCTATGA | GCTCTGGGGC | CCTGCTTGCC | CGACCTCTCT | CACGGGGGCT | 850 |
| GCGGGCGCGT | CCAAGTGTCT | CGGGCGCCCC | TGGGTGGAGG | GCTGGGTGTG | 900 |
| CCTCCCAAGC | TTGGTGGCCA | GCGGGCGGGC | CTGGGTGGCG | GCCTCGTCTG | 950 |
| GTGGGTGGAC | CTTCCAGGGT | CTCCAGCTGG | CTCCGGGGCA | GGAGTGTGG | 1000 |
| GCGGACGAGT | TGTGCCAAGG | GCGGTGCCAC | TGCAACGGCG | CCACCCATCA | 1050 |
| GGTCAACCTGC | CCGACAAGC | AGAGCTGCCC | GGCGGGTGAG | CGCTGCAGCG | 1100 |
| TCCAGAACGG | CCTCCTGGGC | TGCTACCCCG | ATCGCTTCGG | GACCTGCCAG | 1150 |
| GGGTCCGGGG | ACCCACACTA | TGTGAGCTTC | GACGGCGGGC | GCTTCGACTT | 1200 |
| CATGGGCACC | TGCACGTACC | TGCTGGTGGG | CTCATGGGGC | CAGAACGCCAG | 1250 |
| CGGTGCCTGC | CTTCCGGGTG | CTGGTGGAAA | ACGACCATCG | GGGCAGCCAG | 1300 |
| ACTGTGAGCT | ACAAGCGGGC | CGTGGGGGTG | GAGGCGCGCG | GGGTGAAGGT | 1350 |
| GGCCGTGGCG | CGGGAGTACC | CGGGGCAAGT | GCTGGTGGAT | GACGTCTTTC | 1400 |
| AGTATCTGCC | CTTCCAGACA | GCAGATGGGC | AGGTGCAGGT | GTTCGGACAG | 1450 |
| GGCAGGGATG | CCGTCTGTGG | CACGGACTTT | GGCTGACTTG | TCACTTATGA | 1500 |
| CTGGAAATGA | CGAGTGAATG | CCAAGGTGCC | CAGCACTAT | GCTGAGGGCC | 1550 |
| TGTGTGGACT | CTGTGGGAC | TTCAACGGGG | ACCCAGCTGA | TGACCTGGCT | 1600 |
| CTGGCGGGTG | GGGGTCAAGC | TGCCAATGCA | CTGGCCTTTG | GGAACAGCTG | 1650 |
| GCAAGACAG | ACGAGGCGCG | GCTGTGGAGC | AACTGAACCG | GGTGAAGTGC | 1700 |
| CCAAGCTGGA | CTCCCTGGTG | GCCCAGCAGC | TGCAGAGGCA | GAATGAGTGT | 1750 |
| GGAATCCTTG | CCGACCCCA | CGGGCCCTTC | CGGGAGTGCC | ATAGCAAGCT | 1800 |
| GGAACCCACAG | GGTGGCCTGC | GCGACTGTGT | CTATGACCGC | TGCCTGCTGC | 1850 |
| CAGGCCAGTC | TGGGCCACTG | TGTGACGCAC | TGGCCACCTA | TGCTGCTGCA | 1900 |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| TGCCAGGCTG | CTGGAGCCAC | AGTGACCCCC | TGGAGGAGTG | AAGAACCTTG | 1950 |
| CCCCTGAGC | TGCCCCCCCC | ACAGCCACTA | TGAGCGGTGT | TCCTACGGCT | 2000 |
| CCCCGCTGTC | CTGTGGAGAC | CTCCCAATGC | CCGGGGGCTG | TGGCTCAGAA | 2050 |
| TGCCATGAGG | GCTGGGTGTG | CGATCAGGGC | TTTGGGCTCA | GTGGTGAGTC | 2100 |
| CTGGCTGCCC | CTGGCTCTCT | GTGGCTGCGT | ACACCAAGGC | ACCTACCACC | 2150 |
| CACCAAGCCA | GACCTTCTAC | CCTGGCCCCG | GATGTGATTC | CCTTTGCCAC | 2200 |
| TGCCAGGAGG | GCGGCTGTGT | GTCTGTGTAG | TCCTCCAGCT | GCGGACCGCA | 2250 |
| CGAGGCTGTC | CAGCTATCCG | GTGGCAGCTT | GGGTGTGTGT | GCGGTGGGCT | 2300 |
| CTAGCACCTG | CGAGGCGTCA | GGAGACCCCC | ACTACACCA | CTTCGATGGC | 2350 |
| CGCGGCTTCC | ACTTCATGGG | CACCTGCGTG | TATGTGCTGG | CTCAGACCTG | 2400 |
| CGGCACCCGG | CCTGGCTGTC | ATCGGTTTGC | CGTCTGTGAG | GAGAACGTGG | 2450 |
| CCTGGGGTAA | TGGCGGAGTC | AGTGTGACCA | GGGTGATCAC | GGTCCAGGTG | 2500 |
| GCPAACTTCA | CCCTGGGGCT | GGAGCAGACA | CAGTGAAGG | TCACGGTGAA | 2550 |
| CGGTGTGGAC | ATGAAGCTGC | CGGTGGTGCT | GGCAACGGC | CAGATCCGTG | 2600 |
| CCTCCCAAGCA | TGGTTCAGAT | GTTGTGATTG | AGACCGACTT | CGGCTGCGT | 2650 |
| GTGGGCTPAG | ACCTTGTTGA | CTATGTGCGG | GTACCGTCC | CCGGAAACTA | 2700 |
| CTACCAGCAG | ATGTGTGGCC | TGTGTGCGAA | CTACAACGGC | GACCCCAAGG | 2750 |
| ATGACTTCCA | GAAGCCCAAT | GGCTCAGCGG | CAGGCAACGC | CAATGAGTTC | 2800 |
| GGCACTCTCT | GGGAGGAGGT | GGTGCCCGAC | TCTCCCTGCC | TGCGGCCCCAC | 2850 |
| CCCTTGCCCCG | CCGGGGAGCG | AGGACTGTAT | CCCCAGCCAC | AAGTGTCTCT | 2900 |
| CCGAGCTGGA | GAACAAGTAT | CAGAAGGAGG | AGTCTGTGG | GCTCCTCTCC | 2950 |
| AGCCCCACAG | GGCACTGTCT | CTCCTGCCAC | AAGTGGTGG | ATCCCCAGGG | 3000 |
| TCCCTTGAAA | GATTGCATCT | TTGATCTCTG | CCTGGGTGGT | GGGACCTGA | 3050 |
| GCAATCTCTG | CAGCAACATC | CATGCCATAG | TGATGTCTTG | CCAGGCGGCT | 3100 |
| GGAGGCGACG | TGGAGCCCTG | GAGGACTGAA | ACTTCTGTCT | CCATGGAGTG | 3150 |
| CCCTCCGATC | AGTCACTACG | AGCTCTGTGC | GGACACCTGC | TCCCTGGGCT | 3200 |
| GCTCAGCTCT | CAGTGCCCTCT | CCACAGTGCC | AGGATGGGTG | TGCTGAG | 3247 |

【配列番号5】

配列番号：5

配列の長さ：3661

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

配列

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CTATGTGCGG | GTCACCGTCC | CCGAAACTA | CTACCAAGCAG | ATGTGTGGCC | 50 |
| TGTGTGGGAA | CTACAACGGC | GACCCCAAGG | ATGACTTCCA | GAAGCCCAAT | 100 |
| GGCTCACAGG | CAGGTAACGC | CAATGAGTTC | GGCAACTCCT | GGCAGGAGGT | 150 |
| GGTGCCCCAC | TCTCCCTGCC | TGCGGCCAC | CCCTTGCCCC | CCGGGGAGCG | 200 |
| AGGACTGTAT | CCCCAGCCAC | AAGTGTCTTC | CCGAGCTGGA | GAAGAAGTAT | 250 |
| CAGAAGGAGG | AGTTCTGTGG | GCTCCTCTCC | AGCCCCACAG | GGCCACTGTC | 300 |
| CTCCTGCCAC | AAGCTGGTGG | ATCCCCAGGG | TCCCTTGAAA | GATTGCATCT | 350 |
| TTGATCTCTG | CCTGGGTGGT | GGGACCTGA | GCAATCTCTG | CAGCAACATC | 400 |
| CATGCTACG | TGAGTGCTTG | CCAGGCGGCT | GGAGGCCACG | TGGAGCCCTG | 450 |
| GAGGACTGAA | ACTTTCTGTC | CCATGGAGTG | CCCTCCGAC | AGTCACTACG | 500 |
| AGCTCTGTGC | GGACACCTGC | TCCCTGGGCT | GCTCAGTCT | CAGTGGCCCT | 550 |
| CCACAGTGCC | AGGATGGGIG | TGCTGAGGCC | TGCCAGTGTG | ACTCCGGCTT | 600 |
| CCTCTACAAT | GGCCPAGCCT | GCGTGCCCAT | CCAGCAATGC | GGCTGCTACC | 650 |
| ACAATGGTGT | CTACTATGAG | CCGACCGAGA | CAGTCTCAT | TGACAACTGT | 700 |
| CGGCAGCAGT | GCACGTGCCA | TGCGCGTAAA | GGCATGGTGT | GCCAGGAACA | 750 |
| CACTGTCAAG | CCGGGGCAGG | TGTGCCAGCC | CTCCGGAGGC | ATCCTGAGCT | 800 |
| GCGTCACCAA | AGACCCGTGC | CACGGCGTGA | CATGCCGGCC | ACAGGAGACA | 850 |
| TGCAAGGAGC | AGGGTGGCCA | GGCGTGTGC | CTGCCCACT | ATGAGGCCAC | 900 |
| GTGCTGGCTG | TGGGGCGACC | CACACTACCA | CTCCTTGAT | GGCCGGAGT | 950 |
| TTGACTTCCA | GGGCACCTGT | AACTATGTGC | TGGCACAAC | TGGCTGCCCG | 1000 |
| GGGGTCAGCA | CCCAGGGCCT | GACACCCCTC | ACCGTCACCA | CCPAGAACCA | 1050 |
| GAACCGGGGC | AACCCCTGCTG | TGTCTACGT | GAGAGTCGTC | ACCGTGGCTG | 1100 |
| CCCTCGGCAC | CAACATCTCC | ATCCACPAGG | ACGAGATCGG | CAAGTCCGG | 1150 |
| GTGAACGGTG | TGCTCACAGC | CTTGCTGTTC | TCTGTGSCCG | ACGGSCGGAT | 1200 |
| TTCACTGACC | CAGGGTGCAT | CGPAGGCACT | GCTGGTGGCT | GACTTTGGAC | 1250 |
| TGCAAGTCAG | CTATGACTGG | AACTGGGGGG | TAGACGTGAC | GCTGCCCAAC | 1300 |
| AGCTATCATG | GCGCAGTGTG | CGGGCTCTGC | GGTAACATGG | ACCGCAACCC | 1350 |
| CAACAATGAC | CAGGTCTTCC | CTAATGGCAC | ACTGGCTCCC | TCCATACCCA | 1400 |
| TCTGGGGCGG | CAGCTGGCGA | GCCCCAGGCT | GGGACCCACT | GTGTTGGGAC | 1450 |
| GAATGTGCGG | GGTCTGCCC | AACGTGCCCT | GAGGACCGGT | TGGAGCAGTA | 1500 |
| CGAGGGCCCT | GGTTCTGCG | GACCCCTGGC | CCCCGGCACA | GGGGGCCCTT | 1550 |
| TCACCACTG | CCATGCTCAT | GTGCCACCTG | AGAGCTTCTT | CAAGGGCTGT | 1600 |
| GTTCGTGACG | TCTGCAATGG | TGGTGGGGAC | CGTGACATTC | TTTGCAAGGC | 1650 |
| TCTGGCTTCC | TATGTGGCCG | CCTGCCAGGC | TGCTGGGGTT | GTCAATCGAG | 1700 |
| ACTGGCGGCC | ACAGTTGGC | TGTGAGTCA | CCTGCCCGCA | AAACAGCCAC | 1750 |
| TATGAGGTCT | GTGGGCCACC | CTGCCCGGCC | AGCTGTCCGT | CCCCTGCACC | 1800 |
| CCTTACGACG | CCAGCCGTAT | GTGAGGGCCC | CTGTGTGAG | GGCTGCCAGT | 1850 |
| GCGACGCGGG | TTTGTGTGTA | AGTGCTGACC | GCTGTGTTC | CCTCAACAC | 1900 |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GGCTGGGGCT | GCTGGGCCAA | TGGCACCTAC | CACGAGGCGG | GCAGTGAGTT | 1950 |
| TTGGGCTGAT | GGCACCTGCT | CCCAGTGGTG | TGGCTGGGGG | CCTGGGGGTG | 2000 |
| GCTGGCTGGT | CTGCACACCT | GCCAGCTGTG | GGCTGGGTGA | AGTGTGTGGC | 2050 |
| CTCTGGCAT | CCGGCCAGCA | CGGCTGCCAG | CCCGTCAGCA | CAGCTCAGTG | 2100 |
| CCAGGCGTGG | GGTGACCCCC | ATTACGTCAC | TCTGGATGGG | CACCGATTCA | 2150 |
| ATTTCCAAAG | CACCTGGGAG | TACCTGCTGA | GTGCACCTTG | CCACGGACCA | 2200 |
| CCCTTGGGGG | CTGAGAACTT | CACTGTCACT | GTAGCCAAATG | AGCACCGGGG | 2250 |
| CAGCCAGGCT | GTCAGCTACA | CCCGCAGTGT | CACCTTGCAA | ATCTACAACC | 2300 |
| ACAGGCTGAC | ACTGAGTGCC | CGCTGGCCCC | GGAGGCTACA | GGTGGACGGC | 2350 |
| GTGTTCGTCA | CTCTGCCCTT | CCAGCTGGAC | TGGCTCCTGC | ACGCACACCT | 2400 |
| GAGGGGCGCC | GACGTGGTGG | TGACCAACAC | CTCAGGGCTC | TGGCTGGCTT | 2450 |
| TCCAGGGGGA | CAGCTTCGTG | CGCCTGGCGG | TGGCGGGGGC | GTAAGGGGGC | 2500 |
| TCTCTGTGTG | GCTTATGCGG | GAACTACAC | CAGGACCCCG | CAGACGACCT | 2550 |
| GAAGGGGGTG | GGGGGGAAGC | CCGCGGATG | GCAGGTGGGC | GGGGCCAGG | 2600 |
| GCTGGGGGGA | ATGTGTGTCC | AAGCCATGCC | CGTGGCGGTG | CACCCACAG | 2650 |
| CAGCAAGAGT | CCTTCGGGCG | CCCGGACGGC | TGGGGGTGA | TCTCCGCCAC | 2700 |
| CGACGGGCGG | CTGGGGCCCT | GCCACGGGCT | TGTGGCGCCC | GCGCAGTACT | 2750 |
| TCCAGGGGTG | CTTGCTGGAC | GCCTGCCAAG | TTCAGGGGCA | TCTCGAGGSC | 2800 |
| CTCTGTCTTG | CAGTGGCCAC | CTACGTGGCA | GCCTGTACAG | CGCTGGGGCC | 2850 |
| CCAGCTCCGC | GAGTGGAGGC | GGCGGGAATT | CTGTCCCTTC | CAGTGCCTTG | 2900 |
| CCCACAGCCA | CTACGAGCTC | TGCGGTGACT | CCTGTCTCTG | GAGCTGCCCC | 2950 |
| AGCCTGTCCG | CACCGAGGG | CTGTGAGTCG | GCCTGCGGTG | AAGGCTGTGT | 3000 |
| CTGCCATGCT | GCTTTCGTGC | TCAGTGGTGA | CACGTGTGTA | CCTGTGGGGC | 3050 |
| AGTGTGGCTG | CCTCCACGAT | GACCGTACT | ACCCACTGGG | CCAGACCTTC | 3100 |
| TACCCCTGGC | CTGGGTGTGA | TTCCCTTTTC | CGCTGCCGGG | AGGGCGGTGA | 3150 |
| GGTGTCTGT | GAGCCCTCCA | GCTGGCGGCC | GCATGACACC | TGCCGGGCAAT | 3200 |
| CCGGTGGCAG | CTTGGGCTGC | GTGGCGGTGG | GCTCTACCAAC | CTGCCAGGGC | 3250 |
| TCCGGAGATC | CCCACTACAC | CACCTTCGAT | GGCGGCGGCT | TGCACTTCAT | 3300 |
| GGGCACCTGC | GIGTATGTGC | TGGCTCAGAC | CTGGGSCACC | CGGCTGGGCC | 3350 |
| TACATCGGTT | TGCCGTCTTG | CAGGAGAACG | TGGCTGGGGG | TAATGSGGCA | 3400 |
| GTCAGTGTGA | CCAGGGTGT | CACGGTCCAG | GTGGCAAACT | TCAACCTGGG | 3450 |
| GCTGGAGCAG | AGACAGTGG | AGGTACGGT | GAACGGTGTG | GACATGAAGC | 3500 |
| TGCGCGTGST | GCTGGCCAAC | GGCCAGATCC | GTGGCTCCCA | GCATGGTTCA | 3550 |
| GATGTGTGTA | TTGAGACCG | CTTGGGCTTG | CGTGTGGGCT | ACGACCTTGT | 3600 |
| GTACTATGTG | CGGGTCACCG | TCCCTGCAAA | CTACTACCAG | CTGATGTGTG | 3650 |
| GCTGTGTGG | G | | | | 3661 |

【配列番号6】

配列番号：6

配列の長さ：7824

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

配列

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| gccccccgat | ccCTGCAGCC | ATGGGTGCCC | TATGGAGCTG | GTCGATACTC | 50 |
| | MetGlyAlaL | euTrpSerTr | pTrpIleLeu | | |
| TGGGCTGGAG | CAACCTCCT | GTGGGGATTG | ACCCAGGAGG | CTTCAGTGGA | 100 |
| TrpAlaGlyA | laThrLeuLe | uTrpGlyLeu | ThrGlnGluA | laSerValAs | |
| CCTCAAGAAC | ACTGGCAGAG | AGGAATTCCT | CACAGCCTTC | CTGCAGAACT | 150 |
| pLeuLysAsn | ThrGlyArgG | luGluPheLe | uThrAlaPhe | LeuGlnAsnT | |
| ATCAGCTGGC | CTACAGCAAG | GCCTACCCCC | GCCTCCTTAT | CTCCAGTCTG | 200 |
| yrGlnLeuAl | aTyrSerLys | AlaTyrProA | rgLeuLeuIl | eSerSerLeu | |
| TCAGAGAGCC | CCGCTTCAGT | CTCCATCCTC | AGCCAGGCAG | ACAACACCTC | 250 |
| SerGluSerP | roAlaSerVa | lSerIleLeu | SerGlnAlaA | spAsnThrSe | |
| AAAGAAGGTC | ACAGTGAGGC | CCGGGGAGTC | GGTCATGGTC | AACATCAGTG | 300 |
| rLysLysVal | ThrValArgP | roGlyGluSe | rValMetVal | AsnIleSerA | |
| CCAGGCTGA | GATGATAGGC | AGCAAGATCT | TCCAGCATGC | GGTGGTGATC | 350 |
| laLysAlaGl | uMetIleGly | SerLysIleP | heGlnHisAl | aValValIle | |
| CATTCTGACT | ATGCCATCTC | TGTGCAGGCA | CTAATGCCA | AGCCTGACAC | 400 |
| HisSerAspT | yrAlaIleSe | rValGlnAla | LeuAsnAlaL | ysProAspTh | |
| AGCGGAGCTG | ACACTGCTGC | GGCCCATCCA | GGCCCTAGGC | ACCGAGTATT | 450 |
| rAlaGluLeu | ThrLeuLeuA | rgProIleGl | nAlaLeuGly | ThrGluTyrP | |
| TGTGCTCAC | ACCCCCCGGC | ACCTCAGCCA | GGAATGTCAA | GGAGTTTGCC | 500 |
| heValLeuTh | rProProGly | ThrSerAlaA | rgAsnValLy | sGluPheAla | |
| GTGGTGGCGG | GTGCGGCAGG | TGCCTCGGTC | AGTGTACGGC | TGAAGGGGTC | 550 |
| ValValAlaG | lyAlaAlaGl | yAlaSerVal | SerValThrL | euLysGlySe | |
| AGTGACATTC | ATGGCAAGT | TCTATCCAGC | AGGCGATGTC | CTAAGAGTGA | 600 |
| rValThrPhe | AsnGlyLysP | heTyrProAl | aGlyAspVal | LeuArgValT | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CTCTACAGCC | CTACAATGTG | CCCCAGCTAC | AGAGCTCAGT | GGATCTCTCG | 650 |
| hrLeuGlnPr | oTyrAsnVal | AlaGlnLeuG | lnSerSerVa | lAspLeuSer | |
| GGGTCAAAGG | TCACAGCTAG | TAGCCCCGTG | GCTGTCTCT | CTGGCCACAG | 700 |
| GlySerLysV | alThrAlaSe | rSerProVal | AlaValLeuS | erGlyHisSe | |
| CTGTGCGCAG | AAACATACGA | CCTGCPACCA | TGTGGTTGAG | CAGCTGCTAC | 750 |
| rCysAlaGln | LysHisThrT | hrCysAsnFi | sValValGlu | GlnLeuLeuP | |
| CCACGTCTGC | CTGGGGCACC | CACTATGTAG | TACCCACGCT | GGCCTCCCPA | 800 |
| roThrSerAl | aTrpGlyThr | HisTyrValV | alProThrLe | uAlaSerGln | |
| TCTCGCTATG | ATTGGCCTT | CGTTGTGGCC | AGCCAGGCCA | CAAAGCTGAC | 850 |
| SerArgTyrA | spLeuAlaPh | eValValAla | SerGlnAlaT | hrLysLeuTh | |
| CTACAACCAT | GGGGGTATCA | CTGGCTCCCG | TGGGCTCCAG | GCAGGTGATG | 900 |
| rTyrAsnHis | GlyGlyIleT | hrGlySerAr | gGlyLeuGln | AlaGlyAspV | |
| TGGTAGAGTT | TGAGGTCCGG | CCATCTGGC | CACTCTACCT | GTCTGCAAPT | 950 |
| alValGluPh | eGluValArg | ProSerTrpP | roLeuTyrLe | uSerAlaAsn | |
| GTTGGCATCC | AGGTCTGTGT | GTTTGGCACA | GGTGCCATAA | GGAATGAAGT | 1000 |
| ValGlyIleG | lnValLeuLe | uPheGlyThr | GlyAlaIleA | rgAsnGluVa | |
| GACTTATGAC | CCCTACCTGG | TCCTGATCCC | AGATGTGGCG | GCCTACTGCC | 1050 |
| lThrTyrAsp | ProTyrLeuV | alLeuIlePr | oAspValAla | AlaTyrCysP | |
| CAGCCTATGT | GGTCAAGAGT | GTACCAGGCT | GTCAGGGCGT | GGCCCTGGTA | 1100 |
| roAlaTyrVa | lValLysSer | ValProGlyC | ysGluGlyVa | lAlaLeuVal | |
| GTGGCACAGA | CGAAGGCTAT | CAGCGGGCTG | ACCATAGATG | GGCATGCAGT | 1150 |
| ValAlaGlnT | hrLysAlaIl | eSerGlyLeu | ThrIleAspG | lyHisAlaVa | |
| GGGGGCCAAG | CTCACCTGGG | AGGCTGTGCC | AGGCAGTGAG | TTCTCGTATG | 1200 |
| lGlyAlaLys | LeuThrTrpG | luAlaValPr | cGlySerGlu | PheSerTyrA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CTGAAGTGGG | GCTCGGCACA | GCTGACATGA | TCCACACGGC | CGAGGCCACC | 1250 |
| laGluValGI | uLeuGlyThr | AlaAspMetI | leHisThrAl | aGluAlaThr | |
| ACCAACTTGG | GACTGCTCAC | CTTCGGGCTG | GCCAAGGCTA | TAGGCTACGC | 1300 |
| ThrAsnLeuG | lyLeuLeuTh | rPheGlyLeu | AlaLysAlaI | leGlyTyrAl | |
| AACAGCTGCT | GATTGGGGCC | GCACTGTACT | GTCCCCAGTG | GAGCCCTCCT | 1350 |
| aThrAlaAla | AspCysGlyA | rgThrValLe | uSerProVal | GluProSerC | |
| GCGAAGGCAT | GCAGTGGCCA | GCCGGGCGAG | GCTGCCAGGT | GTTAGGCGGG | 1400 |
| ysGluGlyMe | tGlnCysAla | AlaGlyGlnA | rgCysGlnVa | lValGlyGly | |
| AAGGCGGGGT | GTGTGGCGGA | GTCCACCGCT | GTCTGCCGCG | CCCAGGGCGA | 1450 |
| LysAlaGlyC | ysValAlaGI | uSerThrAla | ValCysArgA | laGlnGlyAs | |
| CCCCATTAC | ACCACCTTCG | ACGGCCGTCG | CTACGACATG | ATGGGCACCT | 1500 |
| pProHisTyr | ThrThrPheA | spGlyArgAr | gTyrAspMet | MetGlyThrC | |
| GTTCGTACAC | GATGGTGGAG | CTGTGCAGCG | AGCAGCACAC | CCTGCCCGCC | 1550 |
| ysSerTyrTh | rMetValGlu | LeuCysSerG | luAspAspTh | rLeuProAla | |
| TTCAGCGTGG | AGGCCAAGAA | CGAGCACCGG | GCCAGCGGCC | GCGTCTCCTA | 1600 |
| PheSerValG | luAlaLysAs | nGluHisArg | GlySerArgA | rgValSerTy | |
| CGTGGGCCTC | GTCACTGTGC | GCGCCTACAG | CCACTCTGTG | TCGCTGACCC | 1650 |
| rValGlyLeu | ValThrValA | rgAlaTyrSe | rHisSerVal | SerLeuThrA | |
| GCGGTGAAGT | TGGCTTCGTC | CTGGTTGACA | ACCAGCGCTC | GCGCCTGCCA | 1700 |
| rgGlyGluVa | lGlyPheVal | LeuValAspA | snGlnArgSe | rArgLeuPro | |
| GTCTCCCTGA | GTGAGGGTCG | CCTGCGTGTG | TACCAGAGCG | GACCACGGGC | 1750 |
| ValSerLeuS | erGluGlyAr | gLeuArgVal | TyrGlnSerG | lyProArgAl | |
| CGTGGTGGAG | CTGGTCTTTG | GGCTGGTGGT | CACTTATGAC | TGGGACTGCC | 1800 |
| aValValGlu | LeuValPheG | lyLeuValVa | lThrTyrAsp | TrpAspCysG | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| AGCTGGCACT | CAGCCTGCCT | GCACGCTTCC | AAGACCAGGT | GTGCGGGCTG | 1850 |
| lnLeuAlaLe | uSerLeuPro | AlaArgPheG | lnAspGlnVa | lCysGlyLeu | |
| TGTGGCAACT | ATAATGGTGA | CCCAGCAGAC | GACTTCCTCA | CGCCTGACGG | 1900 |
| CysGlyAsnT | yrAsnGlyAs | pProAlaAsp | AspPheLeuT | hrProAspGl | |
| GGCTCTGGCT | CCTGACGCTG | TGGAGTTCCG | AAGTAGCTGG | AAGCTGGCATG | 1950 |
| yAlaLeuAla | ProAspAlaV | alGluPheAl | aSerSerTrp | LysLeuAspA | |
| ATGGGGACTA | CCTGTGTGAG | GATGGCTGCC | AGAACAACCTG | TCCCGCCTGC | 2000 |
| spGlyAspTy | rLeuCysGlu | AspGlyCysG | lnAsnAsnCy | sProAlaCys | |
| ACCCCAAGGC | AGGCCCAACA | CTATGAGGGC | GACCGACTCT | GTGGCATGCT | 2050 |
| ThrProGlyG | lnAlaGlnHi | sTyrGluGly | AspArgLeuC | ysGlyMetLe | |
| GACCAAGCTC | GATGGCCCTT | TGGCTGTCTG | CCATGACACC | CTGGACCCCA | 2100 |
| uThrLysLeu | AspGlyProP | heAlaValCy | sHisAspThr | LeuAspProA | |
| GGCCCTTCTT | GGAGCAGTGT | GTATATGACC | TGTGTGTGGT | CGGTGGGGAG | 2150 |
| rgProPheLe | uGluGlnCys | ValTyrAspL | euCysValVa | lGlyGlyGlu | |
| GGGCTCAGCC | TGTGCCGTGG | CCTCAGCGCC | TATGCCCAGG | CCTGTCTGGA | 2200 |
| ArgLeuSerL | euCysArgGl | yLeuSerAla | TyrAlaGlnA | laCysLeuGl | |
| GCTTGGCATC | TGGGTGGGGG | ACTGGAGATC | ACCAGCCPAC | TGCCCCCTGT | 2250 |
| uLeuGlyIle | SerValGlyA | spTrpArgSe | rProAlaAsn | CysProLeuS | |
| CCTGCCCTGC | CAACAGCCGC | TATGAGCTCT | GCGGCCCTGC | TTCGCCGACC | 2300 |
| erCysProAl | aAsnSerArg | TyrGluLeuC | ysGlyProAl | aCysProThr | |
| TCTTGCAACG | GGGCTGCGGC | GCGTCCCAAC | TGCTCCGGGC | GCCCCCTGGT | 2350 |
| SerCysAsnG | lyAlaAlaAl | aProSerAsn | CysSerGlyA | rgProCysVa | |
| GGAGGGCTGC | GTGTGCTTCC | CAGGCTTCGT | GGCCAGCGGC | GGCGCCTGCG | 2400 |
| lGluGlyCys | ValCysLeuP | roGlyPheVa | lAlaSerGly | GlyAlaCysV | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| TGCCGGCCTC | GTCGTGTGGC | TGCACCTTCC | AGGGTCTCCA | GCTCGCTCCG | 2450 |
| alProAlaSe | rSerCysGly | CysThrPheG | lnGlyLeuGl | nLeuAlaPro | |
| GGCCAGGAAG | TGTGGGCGGA | CGAGTTGTGC | CAAGGGGGCT | GCACCTGCAA | 2500 |
| GlyGlnGluV | alTrpAlaAs | pGluLeuCys | GlnArgArgC | ysThrCysAs | |
| CGCCGCCACC | CATCAGGTCA | CCTGCCGCGA | CAAGCAGAGC | TGCCCGGCGG | 2550 |
| nGlyAlaThr | HisGlnValT | hrCysArgAs | pLysGlnSer | CysProAlaG | |
| GTCAGCGCTG | CAGCGTCCAG | AACGGCCTCC | TGGCTGTCTA | CCCCGATCCG | 2600 |
| lyGluArgCy | sSerValGln | AsnGlyLeuL | euGlyCysTy | rProAspArg | |
| TTCGGACCTT | GCCAGGGGTC | CGGGGACCCA | CACTATGTGA | GCTTCGACGG | 2650 |
| PheGlyThrC | ysGlnGlySe | rGlyAspPro | HisTyrValS | erPheAspGl | |
| CCGGCGCTTC | GACTTCATGG | GCACCTGCAC | GTACCTGCTG | GTCGGCTCAT | 2700 |
| yArgArgPhe | AspPheMetG | lyThrCysTh | rTyrLeuLeu | ValGlySerC | |
| CGGGCCAGAA | CGCAGCGCTG | CCTGCCCTTCC | GGGTGCTGGT | GGAAAACGAG | 2750 |
| ysGlyGlnAs | nAlaAlaLeu | ProAlaPheA | rgValLeuVa | lGluAsnGlu | |
| CATCGGGCCA | GCCAGACTGT | GAGCTACACG | CGCGCGGTGC | GGGTGGAGGC | 2800 |
| HisArgGlyS | erGlnThrVa | lSerTyrThr | ArgAlaValA | rgValGluAl | |
| CCGCGGGGTG | AAGGTGGCCG | TGCGCGGGGA | GTACCCCGGG | CAAGTGGTGG | 2850 |
| aArgGlyVal | LysValAlaV | alArgArgGl | uTyrProGly | GlnValLeuV | |
| TGGATGACGT | CCTTCAGTAT | CTGCCCTTCC | AAGCAGCAGA | TGGGCAGGTG | 2900 |
| alAspAspVa | lLeuGlnTyr | LeuProPheG | lnAlaAlaAs | pGlyGlnVal | |
| CAGGTGTTC | GACAGGGCAG | GGATGCCGTC | GRGCGCACGG | ACTTTGGCCT | 2950 |
| GlnValPheA | rgGlnGlyAr | gAspAlaVal | ValArgThrA | spPheGlyLe | |
| GACTGTCACT | TATGACTGGA | ATGCACGAGT | GACTGCCAAG | GTGCCCAGCA | 3000 |
| uThrValThr | TyrAspTrpA | snAlaArgVa | lThrAlaLys | ValProSerS | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GCTATGCTGA | GGCCCTGTGT | GGACTCTGTG | GGAACCTCAA | CGGGGACCCA | 3050 |
| erTyrAlaGl | uAlaLeuCys | GlyLeuCysG | lyAsnPheAs | nGlyAspPro | |
| GCTGATGACC | TGGCTCTGCG | GGTGGGGGT | CAAGCTGCCA | ATGCACTGGC | 3100 |
| AlaAspAspL | euAlaLeuAr | gGlyGlyGly | GlnAlaAlaA | snAlaLeuAl | |
| CTTTGGGAAC | AGCTGGCAAG | AAGACACGAG | GCCCCGCTGT | GGAGCAACTG | 3150 |
| aPheGlyAsn | SerTrpGlnG | luGluThrAr | gProGlyCys | GlyAlaThrG | |
| AACCGGGTGA | CTGTCCCAAG | CTGGAATCCC | TGGTGGCCCA | GCAGCTGCAG | 3200 |
| luProGlyAs | pCysProLys | LeuAspSerL | euValAlaGl | nGlnLeuGln | |
| AGCAAGAATG | AGTGTGGAT | CCTTGCCGAC | CCCAAGGGGC | CCTTCCGGGA | 3250 |
| SerLysAsnG | luCysGlyIl | eLeuAlaAsp | ProLysGlyP | roPheArgGl | |
| GTGCCATAGC | AAGCTGGACC | CCCAGGGTGC | CGTGGCGGAC | TGTGTCTATG | 3300 |
| uCysHisSer | LysLeuAspP | roGlnGlyAl | aValArgAsp | CysValTyrA | |
| ACCGCTGCCT | GCTGCCAGGC | CAGTCTGGGC | CACTGTGTGA | CGCACTGGCC | 3350 |
| spArgCysLe | uLeuProGly | GlnSerGlyP | roLeuCysAs | pAlaLeuAla | |
| ACCTATGCTG | CTGCATGCCA | GGCTGCTGGA | GCCACAGTGC | ACCCCTGGAG | 3400 |
| ThrTyrAlaA | laAlaCysGl | nAlaAlaGly | AlaThrValH | isProTrpAr | |
| GAGTGAAGAA | CTTTGCCCCAC | TGAGCTGCCC | ACCCACAGC | CACTATGAGG | 3450 |
| gSerGluGlu | LeuCysProL | euSerCysPr | oProHisSer | HisTyrGluA | |
| CGTGTTCCTA | CGGCTGCCCCG | CTGTCTGTG | GAGACCTCCC | AGTGCCCGGG | 3500 |
| laCysSerTy | rGlyCysPro | LeuSerCysG | lyAspLeuPr | oValProGly | |
| GGCTGTGGCT | CAGATGCCA | TGAGGGCTGC | GTGTGGGATG | AGGGCTTTGC | 3550 |
| GlyCysGlyS | erGluCysHi | sGluGlyCys | ValCysAspG | luGlyPheAl | |
| GCTCAGTGGT | GAGTCTTGCC | TGCCCCCTGGC | CTCCTGTGGC | TGCGTACACC | 3600 |
| aLeuSerGly | GluSerCysL | euProLeuAl | aSerCysGly | CysValHisG | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| AGGGCACCTA | CCACCCACCA | GGCCAGACCT | TCTACCTGG | CCCCGGATGT | 3650 |
| lnGlyThrTy | rHisProPro | GlyGlnThrP | heTyrProGl | yProGlyCys | |
| GATTCCTTT | GCCACTGCCA | GGAGGGCGGC | CTGGTGTCT | GTGAGTCCTC | 3700 |
| AspSerLeuC | ysHisCysGl | nGluGlyGly | LeuValSerC | ysGluSerSe | |
| CAGCTGGGA | CCGCACGAGG | CCTGCCAGCC | ATCCGGTGGC | AGCTTGGGCT | 3750 |
| rSerCysGly | ProHisGluA | laCysGlnPr | oSerGlyGly | SerLeuGlyC | |
| GTGTGGCGGT | GGGCTCTAGC | AACGTGCCAGG | CGTCAGGAGA | CCCCCACTAC | 3800 |
| ysValAlaVa | lGlySerSer | ThrCysGlnA | laSerGlyAs | pProHisTyr | |
| ACCACCTTCG | ATGGCCCGCG | CTTCGACTTC | ATGGGCAOCT | GCGTGTATGT | 3850 |
| ThrThrPheA | spGlyArgAr | gPheAspPhe | MetGlyThrC | ysValTyrVa | |
| GCTGGCTCAG | ACCTGGGSCA | CCCGGCGCTGG | CCTGCATCGG | TTTGCCGTCC | 3900 |
| lLeuAlaGln | ThrCysGlyT | hrArgProGl | yLeuHisArg | PheAlaValL | |
| TGCAGGAGAA | CGTGGCGCTGG | GCTAATGGGC | GAGTCAGTGT | GACCAGGGTG | 3950 |
| euGlnGluAs | nValAlaTrp | GlyAsnGlyA | rgValSerVa | lThrArgVal | |
| ATCACGGTCC | AGGTGGCAAA | CTTCACCCCTG | CGGCTGGAGC | AGAGACAGTG | 4000 |
| IleThrValG | lnValAlaAs | nPheThrLeu | ArgLeuGluC | lnArgGlnTr | |
| GAAGGTCACG | GTGAACGGTG | TGGACATGAA | GCTGCCCCGTG | GTGCTGGCCA | 4050 |
| pLysValThr | ValAsnGlyV | alAspMetLy | sLeuProVal | ValLeuAlaA | |
| ACGGCCAGAT | CCGTGCCCTCC | CAGCATGGTT | CAGATGTTGT | GATTGAGACC | 4100 |
| snGlyGlnIl | eArgAlaSer | GlnHisGlyS | erAspValVa | lIleGluThr | |
| GACTTCGGCC | TGCGTGTTGGC | CTACGACCTT | GTGTACTATG | TGCGGGTCAC | 4150 |
| AspPheGlyL | euArgValAl | aTyrAspLeu | ValTyrTyrV | alArgValTh | |
| CGTCCCCGGA | AACTACTACC | AGCAGATGTG | TGGCCTGTTG | GGGAATAACA | 4200 |
| rValProGly | AsnTyrTyrG | lnGlnMetCy | sGlyLeuCys | GlyAsnTyrA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ACGGCGACCC | CAAGGATGAC | TTCCAGAAGC | CCAATGGCTC | ACAGGCAGCC | 4250 |
| snGlyAspPr | oLysAspAsp | PheGlnLysP | roAsnGlySe | rGlnAlaGly | |
| AACGCCAATG | AGTTCGGCAA | CTCCTGGGAG | GAGGTGGTGC | CCGACTCTCC | 4300 |
| AsnAlaAsnG | luPheGlyAs | nSerTrpGlu | GluValValP | roAspSerPr | |
| CTGCTGCGG | CCCACCCCTT | GCCCCGCGGG | GAGCGAGGAC | TGTATCCCCA | 4350 |
| oCysLeuPro | ProThrProC | ysProProGl | ySerGluAsp | CysIleProS | |
| GCCACAAGTG | TCCTCCCGAG | CTGGAGAAGA | AGTATCAGAA | GGAGGAGTTC | 4400 |
| erHisLysCy | sProProGlu | LeuGluLysL | ysTyrGlnLy | sGluGluPhe | |
| TGTGGGCTCC | TCTCCAGCCC | CACAGGGCCA | CTGTCTCTCT | GCCACAAGCT | 4450 |
| CysGlyLeuL | euSerSerPr | oThrGlyPro | LeuSerSerC | ysHisLysLe | |
| GGTGGATCCC | CAGGGTCCCT | TGAAAGATTG | CATCTTTGAT | CTCTGCCTGG | 4500 |
| uValAspPro | GlnGlyProL | euLysAspCy | sIlePheAsp | LeuCysLeuG | |
| GTGGTGGGAA | CCTGAGCATT | CTCTGCAGCA | ACATCCATGC | CTACGTGAGT | 4550 |
| lyGlyGlyAs | nLeuSerIle | LeuCysSerA | snIleHisAl | aTyrValSer | |
| GCTTGGCAGG | GGGCTGGAGG | CCACGTGGAG | CCCTGGAGGA | CTGAAACTTT | 4600 |
| AlaCysGlnA | laAlaGlyGl | yHisValGlu | ProTrpArgT | hrGluThrPh | |
| CTGTCCCATG | GAGTGGCCTC | CGAACAGTCA | CTACGAGCTC | TGTGCGGACA | 4650 |
| eCysProMet | GluCysProP | roAsnSerHi | sTyrGluLeu | CysAlaAspT | |
| CCTGCTCCCT | GGGCTGCTCA | GCTCTCAGTG | CCCCTCCACA | GTGCCAGGAT | 4700 |
| hrCysSerLe | uGlyCysSer | AlaLeuSerA | laProProGl | nCysGlnAsp | |
| GGGTGTGCTG | AGGGCTGGCA | GTGTGACTCC | GGCTTCCTCT | ACAATGGCCA | 4750 |
| GlyCysAlaG | luGlyCysGl | nCysAspSer | GlyPheLeuT | yrAsnGlyGl | |
| AGCCTGCGTG | CCCCTCCAGC | AATGCGGCTG | CTACCACAAT | GGTGTCTACT | 4800 |
| nAlaCysVal | ProIleGlnG | lnCysGlyCy | sTyrHisAsn | GlyValTyrT | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ATGAGCCCGA | GCAGACAGTC | CTCATTGACA | ACTGTCCGCA | GCAGTGCACG | 4850 |
| yrGluProGl | uGlnThrVal | LeuIleAspA | snCysArgGl | nGlnCysThr | |
| TGCCATGCCG | GTAAGGCAT | GGTGTGCCAG | GAACACAGCT | GCAAGCCGGG | 4900 |
| CysHisAlaG | lyLysGlyMe | tValCysGln | GluHisSerC | ysLysProGl | |
| GCAGGTGTGC | CAGCCCTCCG | GAGGCATCCT | GAGCTGCGTC | ACCPAAGACC | 4950 |
| yGlnValCys | GlnProSerG | lyGlyIleLe | uSerCysVal | ThrLysAspP | |
| CGTGCCACGG | CGTGACATGC | CGGCCACAGG | AGACATGCAA | GGAGCAGGGT | 5000 |
| roCysHisGl | yValThrCys | ArgProGlnG | luThrCysLy | sGluGlnGly | |
| GGCCAGGCGG | TGTGCCTGCC | CAACTATGAG | GCCACGTGCT | GGCTGTGGGG | 5050 |
| GlyGlnGlyV | alCysLeuPr | oAsnTyrGlu | AlaThrCysT | rpLeuTrpGl | |
| CGACCCACAC | TACCACTCCT | TCGATGGCCG | GAAGTTTGAC | TTCCAGGGCA | 5100 |
| yAspProHis | TyrHisSerP | heAspGlyAr | gLysPheAsp | PheGlnGlyT | |
| CCTGTAACTA | TGTGCTGGCA | ACAACTGGCT | GCCCGGGGGT | CAGCACCCAG | 5150 |
| hrCysAsnTy | rValLeuAla | ThrThrGlyC | ysProGlyVa | lSerThrGln | |
| GGCCTGACAC | CCTTCACCGT | CAGCACCAAG | AACCAGAACC | GGGGCAACCC | 5200 |
| GlyLeuThrP | roPheThrVa | lThrThrLys | AsnGlnAsnA | rgGlyAsnPr | |
| TGCTGTGTCC | TACGTGACAG | TGCTCACCGT | GGCTGCCCTC | GGCACCAACA | 5250 |
| oAlaValSer | TyrValArgV | alValThrVa | lAlaAlaLeu | GlyThrAsnI | |
| TCTCCATCCA | CAAGCAGGAG | ATCGGCAAAG | TCCGGGTGAA | CGGTGTGCTC | 5300 |
| leSerIleHi | sLysAspGlu | IleGlyLysV | alArgValAs | nGlyValLeu | |
| ACAGCCTTGC | CTGTCTCTGT | GGCCGACGGG | CGGATTTGAG | TGACCCAGGG | 5350 |
| ThrAlaLeuP | roValSerVa | lAlaAspGly | ArgIleSerV | alThrGlnGl | |
| TGCATCGAAG | GCACTGCTGG | TGGCTGACTT | TGGACTGCAA | GTCAGCTATG | 5400 |
| yAlaSerLys | AlaLeuLeuV | alAlaAspPh | eGlyLeuGln | ValSerTyrA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ACTGGAACCTG | GCGGGTAGAC | GTGACGCTGC | CCAGCAGCTA | TCATGGCGCA | 5450 |
| spTrpAsnTr | pArgValAsp | ValThrLeuP | roSerSerTy | rHisGlyAla | |
| GTGTGCGGGC | TCTGCGGTAA | CATGGACCGC | AACCCCAACA | ATGACCAGGT | 5500 |
| ValCysGlyL | euCysGlyAs | nMetAspArg | AsnProAsnA | snAspGlnVa | |
| CTTCCCTAAT | GGCACACTGG | CTCCCTCCAT | ACCCATCTGG | GGCGGCAGCT | 5550 |
| lPheProAsn | GlyThrLeuA | laProSerIl | eProIleTrp | GlyGlySerT | |
| GGCGAGCCCC | AGGCTGGGAC | CCACTGTGTT | GGGACGAATG | TGGGGGTCC | 5600 |
| rpArgAlaPr | cGlyTrpAsp | ProLeuCysT | rpAspGluCy | sArgGlySer | |
| TGCCCCAACGT | GCCCTGAGGA | CGGTTGGAG | CAGTACGAGG | GCCCTGGCTT | 5650 |
| CysProThrC | ysProGluAs | pArgLeuGlu | GlnTyrGluG | lyProGlyPh | |
| CTGGGGACCC | CTGGCCCCCG | GCACAGGGGG | CCCTTTCACC | ACCTGCCATG | 5700 |
| eCysGlyPro | LeuAlaProG | lyThrGlyGl | yProPheThr | ThrCysHisA | |
| CTCATGTGCC | ACCTGAGAGC | TTCTTCAAGG | GCTGTGTCT | GGACGTCTGC | 5750 |
| laHisValPr | oProGluSer | PhePheLysG | lyCysValLe | uAspValCys | |
| ATGGGTGGTG | GGGACCGTGA | CATTCTTTGC | AAGGCTCTGG | CTTCCTATGT | 5800 |
| MetGlyGlyG | lyAspArgAs | pIleLeuCys | LysAlaLeuA | laSerTyrVa | |
| GGCGGCTTGC | CAGGCTGCTG | GGGTGTCTAT | CGAAGACTGG | CGGGCACAGG | 5850 |
| laAlaAlaCys | GlnAlaAlaG | lyValValIl | eGluAspTrp | ArgAlaGlnV | |
| TGGGCTGTGA | GATCACTTGC | CCAGAAAACA | GCCACTATGA | GGTCTGTGGC | 5900 |
| alGlyCysGl | uIleThrCys | ProGluAsnS | erHisTyrGl | uValCysGly | |
| CCACCCCTGCC | CGGCCAGCTG | TCCGTCCCTT | GCACCCCTTA | CGACGCCAGC | 5950 |
| ProProCysP | roAlaSerCy | sProSerPro | AlaProLeuT | hrThrProAl | |
| CGTATGTGAG | GGCCCCCTGTG | TGGAGGGCTG | CCAGTGGGAC | GCGGGTTTCG | 6000 |
| aValCysGlu | GlyProCysV | alGluGlyCy | sGlnCysAsp | AlaGlyPheV | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| TGTTAAGTGC | TGACCGCTGT | GTTCCCTCTCA | ACAACGGCTG | CGGCTGCTGG | 6050 |
| alLeuSerAl | aAspArgCys | ValProLeuA | snAsnGlyCy | sGlyCysTrp | |
| GCCAATGGCA | CCTACCACGA | GGCGGGCAGT | GAGTTTGGG | CTGATGGCAC | 6100 |
| AlaAsnGlyT | hrTyrHisGl | uAlaGlySer | GluPheTrpA | laAspGlyTh | |
| CTGCTCCCTAG | TGGTGTGGT | GCGGGGCTGG | GGGTGGCTCG | CTGGTCTGCA | 6150 |
| rCysSerGln | TrpCysArgC | ysGlyProGl | yGlyGlySer | LeuValCysT | |
| CACCTGCCAG | CTGTGGGCTG | GGTGAAGTGT | GTGGCCTCCT | GCCATCCGGC | 6200 |
| hrProAlaSe | rCysGlyLeu | GlyGluValC | ysGlyLeuLe | uProSerGly | |
| CAGCAGGGCT | GCCAGCCCGT | CAGCACAGCT | GAGTCCACGG | CGTGGGGTGA | 6250 |
| GlnHisGlyC | ysGlnProVa | lSerThrAla | GluCysGlnA | laTrpGlyAs | |
| CCCCATTAC | GTCACCTCTG | ATGGGCACCG | ATTCAATTTC | CAAGGCACCT | 6300 |
| pProHisTyr | ValThrLeuA | spGlyHisAr | gPheAsnPhe | GlnGlyThrC | |
| GCGAGTACCT | GCTGAGTGCA | COCTGCCACG | GACCACCCCT | GGGGGCTGAG | 6350 |
| ysGluTyrLe | uLeuSerAla | ProCysHisG | lyProProLe | uGlyAlaGlu | |
| AACTTCACTG | TCACTGTAGC | CAATGAGCAC | CGGGGCAGCC | AGCCTGTACG | 6400 |
| AsnPheThrV | alThrValAl | aAsnGluHis | ArgGlySerG | lnAlaValSe | |
| CTACACCCGC | AGTGTACCCC | TGCCAAATCTA | CAACCACAGC | CTGACACTGA | 6450 |
| rTyrThrArg | SerValThrL | euGlnIleTy | rAsnHisSer | LeuThrLeuS | |
| GTGCCCCGCTG | GCCCCGGAAG | CTACAGGTGG | ACGGCGTGTT | CGTCACTCTG | 6500 |
| erAlaArgTr | pProArgLys | LeuGlnValA | spGlyValPh | eValThrLeu | |
| CCCTTCCAGC | TGGACTCGCT | CCTGCACGCA | CACCTGAGCG | GCGCCGACGT | 6550 |
| ProPheGlnL | euAspSerLe | uLeuHisAla | HisLeuSerG | lyAlaAspVa | |
| GGTGGTGACC | ACAACCTCAG | GGCTCTCGCT | GGCTTTGAC | GGGGACAGCT | 6600 |
| lValValThr | ThrThrSerG | lyLeuSerLe | uAlaPheAsp | GlyAspSerP | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| TCGTGCGCCT | GCGCGTCCCG | GCGGCGTACG | CGGGCTCTCT | CTGTGGCTTA | 6650 |
| heValArgLe | uArgValPro | AlaAlaTyrA | laGlySerLe | uCysGlyLeu | |
| TGCGGGAAct | ACAACCAGGA | CCCCGCAGAC | GACCTGAAGG | CGGTGGGCGG | 6700 |
| CysGlyAsnT | yrAsnGlnAs | pProAlaAsp | AspLeuLysA | laValGlyGl | |
| GAAGCCCGCC | GGATGGCAGG | TGGGCGGGCG | CCAGGGCTGC | GGGGAATGTG | 6750 |
| yLysProAla | GlyTrpGlnV | alGlyGlyAl | aGlnGlyCys | GlyGluCysV | |
| TGTCCAAGCC | ATGCCCGTCC | CCGTGCACCC | CAGAGCAGCA | AGAGTCCTTC | 6800 |
| alSerLysPr | cCysProSer | ProCysThrP | roGluGlnGl | nGluSerPhe | |
| GGCGCCCCGG | ACGCGTGGGG | CGTGATCTCC | GCCACCGACG | GCCCCGCTGG | 6850 |
| GlyGlyProA | spAlaCysGl | yValIleSer | AlaThrAspG | lyProLeuAl | |
| GCCCTGCCAC | GGCCTTGTC | CGCCCGCGCA | GTACTTCCAG | GGCTGCTTGC | 6900 |
| aProCysHis | GlyLeuValP | roProAlaGl | nTyrPheGln | GlyCysLeuL | |
| TGGACGCCTG | CCAAGTTCAG | GCCCATCCTG | GAGGCGCTTG | TCTTGCAGTG | 6950 |
| euAspAlaCy | sGlnValGln | GlyHisProG | lyGlyLeuCy | sProAlaVal | |
| GCCACCTACG | TGGCAGCCTG | TCAGGCGGCT | GGGGGCCAGC | TCCCGCAGTG | 7000 |
| AlaThrTyrV | alAlaAlaCy | sGlnAlaAla | GlyAlaGlnL | euArgGluTr | |
| GAGGCGGGCG | GACTTCGTTC | CCTTCCAGTG | CCCTGCCCCAC | AGCCACTACG | 7050 |
| pArgArgPro | AspPheCysP | roPheGlnCy | sProAlaHis | SerHisTyrG | |
| AGCTCTGCGG | TGACTTCCTGT | CCTGGGAGCT | GCCCGAGCCT | GTCGGCACCC | 7100 |
| luLeuCysGl | yAspSerCys | ProGlySerC | ysProSerLe | uSerAlaPro | |
| GAGGGCTGTG | AGTCGGCCTG | CCGTGAAGGC | TGTGTCTGGG | ATGCTGGCTT | 7150 |
| GluGlyCysG | luSerAlaCy | sArgGluGly | CysValCysA | spAlaGlyPh | |
| CGTGCTCAGT | GGTGACAGT | GTGTACCTGT | GGGCCAGTGT | GGCTGCCTCC | 7200 |
| eValLeuSer | GlyAspThrC | ysValProVa | lGlyGlnCys | GlyCysLeuH | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ACGATGACCG | CTACTACCCA | CTGGGCCAGA | CCTTCTACCC | TGGCCCTGGG | 7250 |
| isAspAspAr | gTyrTyrPro | LeuGlyGlnT | hrPheTyrPr | oGlyProGly | |
| TGTGATTCCC | TTTGCCGCTG | CCGGGAGGGC | GGTGAGGTGT | CCTGTGAGCC | 7300 |
| CysAspSerL | euCysArgCy | sArgGluGly | GlyGluValS | erCysGluPr | |
| CTCCAGCTGC | GGCCCGCATG | AGACCTGCCG | GCCATCCGGT | GGCAGCTTGG | 7350 |
| oSerSerCys | GlyProHisG | luThrCysAr | gProSerGly | GlySerLeuG | |
| GCTGGGTGGC | CGTGGGCTCT | ACCACCTGCC | AGGGGTGGGG | AGATCCCCAC | 7400 |
| lyCysValAl | aValGlySer | ThrThrCysG | lnAlaSerGl | yAspProHis | |
| TACACCACCT | TCGATGGCCG | CCGCTTCGAC | TTCATGGGCA | CCTGCGTGTA | 7450 |
| TyrThrThrP | heAspGlyAr | gArgPheAsp | PheMetGlyT | hrCysValTy | |
| TGTGCTGGCT | CAGACCTGGG | GCACCCGGCC | TGGCCTACAT | CGGTTTGGCC | 7500 |
| rValLeuAla | GlnThrCysG | lyThrArgPr | oGlyLeuHis | ArgPheAlaV | |
| TCCTGCAGGA | GAACGTGGCC | TGGGGTAATG | GGCGAGTCAG | TGTGACCAGG | 7550 |
| alLeuGlnGl | uAsnValAla | TrpGlyAsnG | lyArgValSe | rValThrArg | |
| GTGATCACGG | TCCAGGTGGC | AAACTTCACC | CTGCGGCTGG | AGCAGAGACA | 7600 |
| ValIleThrV | alGlnValAl | aAsnPheThr | LeuArgLeuG | luGlnArgGl | |
| GTGGTAGGTC | ACGGTGAACG | GTGTGGACAT | GAAGCTGCCC | GTGGTGCTGG | 7650 |
| nTrpLysVal | ThrValAsnG | lyValAspMe | tLysLeuPro | ValValLeuA | |
| CCAAAGGCCA | GATCCGTGCC | TCCAGCATG | GTTCAGATGT | TGTGATTGAG | 7700 |
| laAsnGlyGl | nIleArgAla | SerGlnHisG | lySerAspVa | lValIleGlu | |
| ACCGACTTCG | GCCTGGGTGT | GGCCTACGAC | CTTGTTGTA | ATGTGCGGGT | 7750 |
| ThrAspPheG | lyLeuArgVa | lAlaTyrAsp | LeuValTyrT | yrValArgVa | |
| CACCGTCCCT | GGAACTACT | ACCAGCTGAT | GTGTGGCCTG | TGTGGGgat | 7800 |
| lThrValPro | GlyAsnTyrT | yrGlnLeuMe | tCysGlyLeu | CysGlyGlyS | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| <u>ccactaotta ottaottaac otac</u> | | | | 7824 |
| er | | | | |

【配列番号 7】

配列番号： 7

配列の長さ： 1 6 3 8 2

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直線状

配列の種類： cDNA

配列

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CTGCAGCCAT | GGGTGCCCTA | TGGAGCTGGT | GGATACTCTG | GGCTGGAGCA | 50 |
| Me | tGlyAlaLeu | TrpSerTrpT | rpIleLeuTr | pAlaGlyAla | |
| ACCCCTCCTGT | GGGGATTGAC | CCAGGAGGCT | TCAGTGGACC | TCAAGAACAC | 100 |
| ThrLeuLeuT | rpGlyLeuTh | rGlnGluAla | SerValAspL | euLysAsnTh | |
| TGGCAGAGAG | GAATTCCTCA | CAGCCTTCCT | GCAGAACTAT | CAGCTGGCCT | 150 |
| rGlyArgGlu | GluPheLeuT | hrAlaPheLe | uGlnAsnTyr | GlnLeuAlaT | |
| ACAGCAAGGC | CTACCCCGGC | CTCCTTATCT | CCAGTCTGTC | AGAGAGCCCC | 200 |
| yrSerLysAl | aTyrProArg | LeuLeuIleS | erSerLeuSe | rGluSerPro | |
| GCTTCAGTCT | CCATCCTCAG | CCAGGCAGAC | AACACCTCAA | AGAAGGTCAC | 250 |
| AlaSerValS | erIleLeuSe | rGlnAlaAsp | AsnThrSerL | ysLysValTh | |
| AGTGAGGCCC | GGGGAGTCGG | TCATGGTCAA | CATCAGTGCC | AAGGCTGAGA | 300 |
| rValArgPro | GlyGluSerV | alMetValAs | nIleSerAla | LysAlaGluM | |
| TGATAGGCAG | CAAGATCTTC | CAGCATGCGG | TGGTGATCCA | TTCTGACTAT | 350 |
| etIleGlySe | rLysIlePhe | GlnHisAlaV | alValIleHi | sSerAspTyr | |
| GCCATCTCTG | TGCAGGCACT | AAATGCCAAG | CCTGACACAG | CGGAGCTGAC | 400 |
| AlaIleSerV | alGlnAlaLe | uAsnAlaLys | ProAspThrA | laGluLeuTh | |
| ACTGCTGCGG | CCCATCCAGG | CCCTAGGCAC | CGAGTATTTT | GTGCTCACAC | 450 |
| rLeuLeuArg | ProIleGlnA | laLeuGlyTh | rGluTyrPhe | ValLeuThrP | |
| CCCCCGGCAC | CTCAGCCAGG | AATGTCAAGG | AGTTTGCCGT | GGTGGCCGGT | 500 |
| roProGlyTh | rSerAlaArg | AsnValLysG | luPheAlaVa | lValAlaGly | |
| GCCGCAGGTG | CCTCGGTCAG | TGTCACGCTG | AAGGGGTCAG | TGACATTCAA | 550 |
| AlaAlaGlyA | laSerValSe | rValThrLeu | LysGlySerV | alThrPheAs | |
| TGGCAAGTTC | TATCCAGCAG | GCGATGTCTT | AAGAGTGAAT | CTACAGCCCT | 600 |
| nGlyLysPhe | TyrProAlaG | lyAspValLe | uArgValThr | LeuGlnProT | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ACAATGTGGC | CCAGCTACAG | AGCTCAGTGG | ATCTCTCGGG | GTCAAAGGTC | 650 |
| yrAsnValAl | aGlnLeuGln | SerSerValA | spLeuSerGl | ySerLysVal | |
| ACAGCTAGTA | GCCCCGTGGC | TGTCCTCTCT | GGCCACAGCT | GTGCGCAGAA | 700 |
| ThrAlaSerS | erProValAl | aValLeuSer | GlyHisSerC | ysAlaGlnLy | |
| ACATACGACC | TGCAACCATG | TGGTTGAGCA | GCTGCTACCC | ACGTCTGCCT | 750 |
| sHisThrThr | CysAsnHisV | alValGluGl | nLeuLeuPro | ThrSerAlaT | |
| GGGGCACCCA | CTATGTAGTA | CCCACGCTGG | CCTCCCAATC | TCGCTATGAT | 800 |
| rpGlyThrHi | sTyrValVal | ProThrLeuA | laSerGlnSe | rArgTyrASP | |
| TTGGCCTTCG | TTGTGGCCAG | CCAGGCCACA | AAGCTGACCT | ACAACCATGG | 850 |
| LeuAlaPheV | alValAlaSe | rGlnAlaThr | LysLeuThrT | yrAsnHisGl | |
| GGGTATCACT | GGTCCCGTGG | GGCTCCAGGC | AGGTGATGTG | GTAGAGTTTG | 900 |
| yGlyIleThr | GlySerArgG | lyLeuGlnAl | aGlyAspVal | ValGluPheG | |
| AGGTCCGGGC | ATCCTGGCCA | CTCTACCTGT | CTGCAAATGT | GGGCATCCAG | 950 |
| luValArgPr | oSerTrpPro | LeuTyrLeuS | erAlaAsnVa | lGlyIleGln | |
| GTCCTGTGTG | TTGGCACAGG | TGCCATAAGG | AATGAAGTGA | CTTATGACCC | 1000 |
| ValLeuLeuP | heGlyThrGl | yAlaIleArg | AsnGluValT | hrTyrAspPr | |
| CTACCTGGTC | CTGATCCAG | ATGTGGCGGC | CTACTGCCCA | GCCTATGTGG | 1050 |
| oTyrLeuVal | LeuIleProA | spValAlaAl | aTyrCysPro | AlaTyrValV | |
| TCAAGAGTGT | ACCAGGCTGT | GAGGGCGTGG | CCCTGGTAGT | GGCACAGACG | 1100 |
| alLysSerVa | lProGlyCys | GluGlyValA | laLeuValVa | lAlaGlnThr | |
| AAGGCTATCA | GCGGGCTGAC | CATAGATGGG | CATGCAGTGG | GGGCCAAGCT | 1150 |
| LysAlaIleS | erGlyLeuTh | rIleAspGly | HisAlaValG | lyAlaLysLe | |
| CACCTGGGAG | GCTGTGCCAG | GCAGTGAGTT | CTCGTATGCT | GAAGTGGAGC | 1200 |
| uThrTrpGlu | AlaValProG | lySerGluPh | eSerTyrAla | GluValGluL | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| TCGGCACAGC | TGACATGATC | CACACGGCCG | AGGCCACCAC | CAACTTGGGA | 1250 |
| euGlyThrAl | aAspMetIle | HisThrAlaG | luAlaThrTh | rAsnLeuGly | |
| CTGCTCACCT | TGGGGCTGGC | CAAGGCTATA | GGCTACGCCA | CAGCTGCTGA | 1300 |
| LeuLeuThrP | heGlyLeuAl | aLysAlaIle | GlyTyrAlaT | hrAlaAlaAs | |
| TTGGGGCCGG | ACTGTACTGT | CCCCAGTGGG | GCCCTCCTGC | GAAGGCATGC | 1350 |
| pCysGlyArg | ThrValLeuS | erProValGl | uProSerCys | GluGlyMetG | |
| AGTGGCCAGC | CGGGCAGCCG | TGCCAGGTGG | TAGGCGGGAA | GGCCGGGTGT | 1400 |
| lnCysAlaAl | aGlyGlnArg | CysGlnValV | alGlyGlyLy | sAlaGlyCys | |
| GTGGGGGAGT | CCACCGCTGT | CTGCGCGGCC | CAGGGCGACC | CCCATTACAC | 1450 |
| ValAlaGluS | erThrAlaVa | lCysArgAla | GlnGlyAspP | roHisTyrTh | |
| CACCTTCGAC | GGCCGTGGCT | ACGACATGAT | GGGCACCTGT | TCGTACACGA | 1500 |
| rThrPheAsp | GlyArgArgT | yrAspMetMe | tGlyThrCys | SerTyrThrM | |
| TGGTGGAGCT | GTGCAGCGAG | GACGACACCC | TGCCCGGCTT | CAGCGTGGAG | 1550 |
| etValGluLe | uCysSerGlu | AspAspThrL | euProAlaPh | eSerValGlu | |
| GCCAAGAACG | AGCACCGGGG | CAGCCGCGCG | GTCTCCTACG | TGGGCCTCGT | 1600 |
| AlaLysAsnG | luHisArgGl | ySerArgArg | ValSerTyrV | alGlyLeuVa | |
| CACTGTGGCG | GGCTACAGCC | ACTCTGTGTC | GCTGACCCGC | GGTGAAGTTG | 1650 |
| lThrValArg | AlaTyrSerH | isSerValSe | rLeuThrArg | GlyGluValG | |
| GCTTCGTCTT | GGTTGACAAC | CAGCGCTCGC | GGCTGCCAGT | CTCCCTGAGT | 1700 |
| lyPheValLe | uValAspAsn | GlnArgSerA | rgLeuProVa | lSerLeuSer | |
| GAGGGTGGCC | TGCGTGTGTA | CCAGAGCGGA | CCACGGGGCC | TGGTGGAGCT | 1750 |
| GluGlyArgL | euArgValTy | rGlnSerGly | ProArgAlaV | alValGluLe | |
| GGTCTTTGGG | CTGGTGGTCA | CTTATGACTG | GGACTGCCAG | CTGGCACTCA | 1800 |
| uValPheGly | LeuValValT | hrTyrAspTr | pAspCysGln | LeuAlaLeuS | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GCCTGCCTGC | ACGCTTCCAA | GACCAGGTGT | GCGGGCTGTG | TGCCAACTAT | 1850 |
| erLeuProAl | aArgPheGln | AspGlnValC | ysGlyLeuCy | sGlyAsnTyr | |
| AATGGTGACC | CAGCAGACGA | CTTCCTCAGC | CCTGACGGGG | CTCTGGCTCC | 1900 |
| AsnGlyAspP | roAlaAspAs | pPheLeuThr | ProAspGlyA | laLeuAlaPr | |
| TGACGCTGTG | GAGTTCCGAA | GTAGCTGGAA | GCTGGATGAT | GGGGACTACC | 1950 |
| oAspAlaVal | GluPheAlaS | erSerTrpLy | sLeuAspAsp | GlyAspTyrL | |
| TGTGTGAGGA | TGGCTGCCAG | AACAACCTGTC | CCGCCTGCAC | CCCAGGCCAG | 2000 |
| euCysGluAs | pGlyCysGln | AsnAsnCysP | roAlaCysTh | rProGlyGln | |
| GCCCCAAGCT | ATGAGGGCGA | CCGACTCTGT | GGCATGCTGA | CCAAGCTCGA | 2050 |
| AlaGlnHisT | yrGluGlyAs | pArgLeuCys | GlyMetLeuT | hrLysLeuAs | |
| TGGCCCCCTTC | GCTGTCTGCC | ATGACACCCT | GGACCCGAGG | CCCTTCCTGG | 2100 |
| pGlyProPhe | AlaValCysH | isAspThrLe | uAspProArg | ProPheLeuG | |
| AGCAGTGTGT | ATATGACCTG | TGTGTGGTCG | GTGGGGAGCG | GCTCAGCCTG | 2150 |
| luGlnCysVa | lTyrAspLeu | CysValValG | lyGlyGluAr | gLeuSerLeu | |
| TGCCGTGGCC | TCAGCGGCTA | TGCCCAGGCC | TGTCTGAGGC | TTGGCATCTC | 2200 |
| CysArgGlyL | euSerAlaTy | rAlaGlnAla | CysLeuGluL | euGlyIleSe | |
| GGTTGGGGAC | TGGAGATCAC | CAGCCAACTG | CCCCCTGTCC | TGCCCTGCCA | 2250 |
| rValGlyAsp | TrpArgSerP | roAlaAsnC | sProLeuSer | CysProAlaA | |
| ACAGCCGCTA | TGAGCTCTGC | GGCCCTGCTT | GCCCCAGCTC | CTGCAACGGG | 2300 |
| snSerArgTy | rGluLeuCys | GlyProAlaC | ysProThrSe | rCysAsnGly | |
| GCTGCGGGCG | CGTCCAACTG | CTCCGGGGCG | CCCTGCGTGG | AGGGCTGGGT | 2350 |
| AlaAlaAlaP | roSerAsnC | sSerGlyArg | ProCysValG | luGlyCysVa | |
| GTGCCTCCCA | GGCTTCGTGG | CCAGCGGGCG | CGCCTGCGTG | CCGGCCTCGT | 2400 |
| lCysLeuPro | GlyPheValA | laSerGlyGl | yAlaCysVal | ProAlaSerS | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CGTGTGGCTG | CACCTTCCAG | GGTCTCCAGC | TCGCTCCGGG | CCAGGAAGTG | 2450 |
| erCysGlyCy | sThrPheGln | GlyLeuGlnL | euAlaProGl | yGlnGluVal | |
| TGGGCGGACG | AGTTGTGCCA | AAGGCGCTGC | ACCTGCAACG | GCGCCACCCA | 2500 |
| TrpAlaAspG | luLeuCysGl | nArgArgCys | ThrCysAsnG | lyAlaThrHi | |
| TCAGGTCACC | TGCCGCGACA | AGCAGAGCTG | CCCGCGGGGT | GAGCGCTGCA | 2550 |
| sGlnValThr | CysArgAspL | ysGlnSerCy | sProAlaGly | GluArgCysS | |
| GCGTCCAGAA | CGGCCTCCTG | GGCTGCTACC | CCGATCGCTT | CGGGACCTGC | 2600 |
| erValGlnAs | nGlyLeuLeu | GlyCysTyrP | roAspArgPh | eGlyThrCys | |
| CAGGGGTCCG | GGGACCCACA | CTATGTGAGC | TTCGACGGCC | GGCGCTTCGA | 2650 |
| GlnGlySerG | lyAspProHi | sTyrValSer | PheAspGlyA | rgArgPheAs | |
| CTTCATGGGC | ACCTGCACGT | ACCTGCTGGT | CGGCTCATGC | GGCCAGAACG | 2700 |
| pPheMetGly | ThrCysThrT | yrLeuLeuVa | lGlySerCys | GlyGlnAsnA | |
| CAGCGCTGCC | TGCCCTCCGG | GTGCTGGTGG | AAAACGAGCA | TCGGGGCAGC | 2750 |
| laAlaLeuPr | oAlaPheArg | ValLeuValG | luAsnGluHi | sArgGlySer | |
| CAGACTGTGA | GCTACACGGG | CGCCGTGCGG | GTGGAGGCCC | GCGGGGTGAA | 2800 |
| GlnThrValS | erTyrThrAr | gAlaValArg | ValGluAlaA | rgGlyValLy | |
| GGTGGCCGTG | CGCCGGGAGT | ACCCCGGGCA | AGTGCTGGTG | GATGACGTCC | 2850 |
| sValAlaVal | ArgArgGluT | yrProGlyGl | nValLeuVal | AspAspValL | |
| TTCAGTATCT | GCCCTTCCAA | GCAGCAGATG | GCGAGGTGCA | GGTGTTCCTA | 2900 |
| euGlnTyrLe | uProPheGln | AlaAlaAspG | lyGlnValGl | nValPheArg | |
| CAGGGCAGGG | ATGCCGTCTG | GCGCACGGAC | TTTGGGCTGA | CTGTCACTTA | 2950 |
| GlnGlyArgA | spAlaValVa | lArgThrAsp | PheGlyLeuT | hrValThrTy | |
| TGACTGGAAT | GCAAGAGTGA | CTGCCAAGGT | GCCCAGCAGC | TATGCTGAGG | 3000 |
| rAspTrpAsn | AlaArgValT | hrAlaLysVa | lProSerSer | TyrAlaGluA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CCCTGTGTGG | ACTCTGTGGG | AACTTCAACG | GGGACCCAGC | TGATGACCTG | 3050 |
| laLeuCysGl | yLeuCysGly | AsnPheAsnG | lyAspProAl | aAspAspLeu | |
| GCTCTGCGSG | GTGGGGGTCA | AGCTGCCAAT | GCACTGGCCT | TTGGGACACAG | 3100 |
| AlaLeuArgG | lyGlyGlyGl | nAlaAlaAsn | AlaLeuAlaP | heGlyAsnSe | |
| CTGGCAAGAA | GAGACGAGGC | CCGGCTGTGG | AGCAACTGAA | CCGGGTGACT | 3150 |
| rTrpGlnGlu | GluThrArgP | roGlyCysGl | yAlaThrGlu | ProGlyAspC | |
| GTCCCAAGCT | GGACTCCCTG | GTGGCCCGAG | AGCTGCAGAG | CAAGAATGAG | 3200 |
| ysProLysLe | uAspSerLeu | ValAlaGlnG | lnLeuGlnSe | rLysAsnGlu | |
| TGTGCAATCC | TTGCCGACCC | CAAGGGGCCC | TTCCGGGAGT | GCCATAGCAA | 3250 |
| CysGlyIleL | euAlaAspPr | oLysGlyPro | PheArgGluC | ysHisSerLy | |
| GCTGGACCCC | CAGGGTGGCG | TGCGCGACTG | TGTCTATGAC | CGCTGCCTGC | 3300 |
| sLeuAspPro | GlnGlyAlaV | alArgAspCy | sValTyrAsp | ArgCysLeuL | |
| TGCCAGGCCA | GTCTGGGCCA | CTGTGTGACG | CACTGGCCAC | CTATGCTGCT | 3350 |
| euProGlyGl | nSerGlyPro | LeuCysAspA | laLeuAlaTh | rTyrAlaAla | |
| GCATGCCAGG | CTGCTGGAGC | CACAGTGCCAC | CCCTGGAGGA | GTGAAGAACT | 3400 |
| AlaCysGlnA | laAlaGlyAl | aThrValHis | ProTrpArgS | erGluGluLe | |
| TTGCCCACTG | AGCTGCCAC | CCCACAGCCA | CTATGAGGCG | TGTTCCCTACG | 3450 |
| uCysProLeu | SerCysProp | roHisSerHi | sTyrGluAla | CysSerTyrG | |
| GCTGCCCGCT | GTCTGTGGA | GACCTCCCAG | TGCCCGGGGG | CTGTGGCTCA | 3500 |
| lyCysProLe | uSerCysGly | AspLeuProV | alProGlyGl | yCysGlySer | |
| GAATGCCATG | AGCGCTGGGT | GTGGCATGAG | GGCTTTGGGC | TCAGTGGTGA | 3550 |
| GluCysHisG | luGlyCysVa | lCysAspGlu | GlyPheAlaL | euSerGlyGl | |
| GTCTGCCTG | CCCTGGCCT | CCTGTGGCTG | CGTACACCAG | GGCACCTACC | 3600 |
| uSerCysLeu | ProLeuAlaS | erCysGlyCy | sValHisGln | GlyThrTyrH | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ACCCACCAGG | CCAGACCTTC | TACCCTGGCC | CCGGATGTGA | TTCCCTTTGC | 3650 |
| isProProGl | yGlnThrPhe | TyrProGlyP | roGlyCysAs | pSerLeuCys | |
| CACTGCCAGG | AGGGGGGGCT | GGTGTCTGT | GAGTCTTCCA | GCTGGGGACC | 3700 |
| HisCysGlnG | luGlyGlyLe | uValSerCys | GluSerSerS | erCysGlyPr | |
| GCACGAGGCC | TGCCAGCCAT | CCGGTGGCAG | CTTGGGCTGT | GTGGCGGTGG | 3750 |
| oHisGluAla | CysGlnProS | erGlyGlySe | rLeuGlyCys | ValAlaValG | |
| GCTCTAGCAC | CTGCCAGGCG | TCAGGAGACC | CCCACTACAC | CACCTTCGAT | 3800 |
| lySerSerTh | rCysGlnAla | SerGlyAspP | roHisTyrTh | rThrPheAsp | |
| GGCGCGCGCT | TCGACTTCAT | GGGCACCTGC | GTGTATGTGC | TGGCTCAGAC | 3850 |
| GlyArgArgP | heAspPheMa | tGlyThrCys | ValTyrValL | euAlaGlnTh | |
| CTGGCGCACC | CGGCCTGGCC | TGCATCGGTT | TGCCGTCTCTG | CAGGAGAACC | 3900 |
| rCysGlyThr | ArgProGlyL | euHisArgPh | eAlaValLeu | GlnGluAsnV | |
| TGGCCTGGGG | TAATGGGCGA | GTCAGTGTCG | CCAGGGTGAT | CACGGTCCAG | 3950 |
| alAlaTrpGl | yAsnGlyArg | ValSerValT | hrArgValIl | eThrValGln | |
| GTGGCAAACT | TCACCCTGCG | GCTGGAGCAG | AGACAGTGGG | AGGTCACGGT | 4000 |
| ValAlaAsnP | heThrLeuAr | gLeuGluGln | ArgGlnTrpL | ysValThrVa | |
| GAACGGTGTG | GACATGAAGC | TGCCCGTGGT | GCTGGCCAAC | GGCCAGATCC | 4050 |
| lAsnGlyVal | AspMetLysL | euProValVa | lLeuAlaAsn | GlyGlnIleA | |
| GTGCCTCCCA | GCATGGTTCA | GATGTTGTGA | TTGAGACCGA | CTTCGGCCTG | 4100 |
| rgAlaSerGl | nHisGlySer | AspValValI | leGluThrAs | pPheGlyLeu | |
| CGTGTTGGCCT | ACGACCTTGT | GTACTATGTG | CGGGTCACCG | TCCCCGGAAA | 4150 |
| ArgValAlaT | yrAspLeuVa | lTyrTyrVal | ArgValThrV | alProGlyAs | |
| CTACTACCAG | CAGATGTGTG | GCCTGTGTGG | GAAGTACAAC | GGCGACCCCA | 4200 |
| nTyrTyrGln | GlnMetCysG | lyLeuCysGl | yAsnTyrAsn | GlyAspProL | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| AGGATGACTT | CCAGAAGCCC | AATGGCTCAC | AGGCAGGCAA | CGCCAATGAG | 4250 |
| ysAspAspPh | eGlnLysPro | AsnGlySerG | lnAlaGlyAs | nAlaAsnGlu | |
| TTCGGCAACT | CCTGGGAGGA | GGTGGTGCCC | GACTCTCCCT | GCCTGCCGCC | 4300 |
| PheGlyAsnS | erTrpGluGl | uValValPro | AspSerProC | ysLeuProPr | |
| CACCCCTTGC | CCGCGGGGA | GCGAGGACTG | TATCCCCAGC | CACAAGTGTC | 4350 |
| oThrProCys | ProProGlyS | erGluAspCy | sIleProSer | HisLysCysP | |
| CTCCCGAGCT | GGAGAAGAAG | TATCAGAAGG | AGGAGTTCTG | TGGGCTCCTC | 4400 |
| roProGluLe | uGluLysLys | TyrGlnLysG | luGluPheCy | sGlyIeuLeu | |
| TCCAGCCCCA | CAGGGCCACT | GTCCTCCTGC | CACAAGCTGG | TGGATCCCCA | 4450 |
| SerSerProT | hrGlyProLe | uSerSerCys | HisLysLeuV | alAspProGl | |
| GGGTCCCTTG | AAAGATTGCA | TCTTTGATCT | CTGCCTGGGT | GGTGGGAACC | 4500 |
| nGlyProLeu | LysAspCysI | lePheAspLe | uCysLeuGly | GlyGlyAsnL | |
| TGAGCATTCT | CTGCAGCAAC | ATCCATGCCT | ACGTGAGTGC | TTGCCAGGCG | 4550 |
| euSerIleLe | uCysSerAsn | IleHisAlaT | yrValSerAl | aCysGlnAla | |
| GCTGGAGGCC | ACGTGGAGCC | CTGGAGGACT | GAACTTTCT | GTCCCATGGA | 4600 |
| AlaGlyGlyH | isValGluPr | oTrpArgThr | GluThrPheC | ysProMetGl | |
| GTGCCCTCCG | AACAGTCACT | ACGAGCTCTG | TGCGGACACC | TGCTCCCTGG | 4650 |
| uCysProPro | AsnSerHisT | yrGluLeuCy | sAlaAspThr | CysSerLeuG | |
| GCTGCTCAGC | TCTCAGTGCC | CCTCCACAGT | GCCAGGATGG | GTGTGCTGAG | 4700 |
| lyCysSerAl | aLeuSerAla | ProProGlnC | ysGlnAspGl | yCysAlaGlu | |
| GGCTGCCAGT | GTGACTCCGG | CTTCCTCTAC | AATGGCCAAG | CCTGCGTGCC | 4750 |
| GlyCysGlnC | ysAspSerGl | yPheLeuTyr | AsnGlyGlnA | laCysValPr | |
| CATCCAGCAA | TGCGGCTGCT | ACCACAATGG | TGTCTACTAT | GAGCCGGAGC | 4800 |
| oIleGlnGln | CysGlyCysT | yrHisAsnGl | yValTyrTyr | GluProGluG | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| AGACAGTCCT | CATTGACAAC | TGTGCCCAGC | AGTGCACTG | CCATGCGGGT | 4850 |
| lnThrValle | uIleAspAsn | CysArgGlnG | lnCysThrCy | sHisAlaGly | |
| AAAGGCATGG | TGTGCCAGGA | ACACAGCTGC | AAGCCGSGGC | AGGTGTGCCA | 4900 |
| LysGlyMetV | alCysGlnGl | uHisSerCys | LysProGlyG | lnValCysGl | |
| GCCCTCCGGA | GGCATCCTGA | GCTGCGTCAC | CAPAGACCCG | TGCCACGGCG | 4950 |
| nProSerGly | GlyIleIeuS | erCysValTh | rLysAspPro | CysHisGlyV | |
| TGACATGCCG | GCCACAGGAG | ACATGCAAGG | AGCAGGGTGG | CCAGGGCGTG | 5000 |
| alThrCysAr | gProGlnGlu | ThrCysLysG | luGlnGlyGl | yGlnGlyVal | |
| TGCCTGCCCA | ACTATGAGGC | CACGTGCTGG | CTGTGGGGCG | ACCCACACTA | 5050 |
| CysLeuProA | snTyrGluAl | aThrCysTrp | LeuTrpGlyA | spProHisTy | |
| CCACTCCTTC | GATGGCCGGA | AGTTTGACTT | CCAGGGCACC | TGTAACATATG | 5100 |
| rHisSerPhe | AspGlyArgL | ysPheAspPh | eGlnGlyThr | CysAsnTyrV | |
| TGCTGGCAAC | AACTGGCTGC | CCGGGGGTCA | GCACCCAGGG | CCTGACACCC | 5150 |
| alLeuAlaTh | rThrGlyCys | ProGlyValS | erThrGlnGl | yLeuThrPro | |
| TTCACCGTCA | CCACCAAGAA | CCAGAACCGG | GGCAACCCCTG | CTGTGTCCCTA | 5200 |
| PheThrValT | hrThrLysAs | nGlnAsnArg | GlyAsnProA | laValSerTy | |
| CGTGAGAGTC | GTCACCGTGG | CTGCCCTCGG | CACCAACATC | TCCATCCACA | 5250 |
| rValArgVal | ValThrValA | laAlaLeuGl | yThrAsnIle | SerIleHisL | |
| AGGACGAGAT | CGGCAAGTC | CGGGTGAACG | GTGTGCTCAC | AGCCTTGCCT | 5300 |
| ysAspGluIl | eGlyLysVal | ArgValAsnG | lyValLeuTh | rAlaLeuPro | |
| GTCTCTGTGG | CCGACGGGCG | GATTTCAGTG | ACCCAGGGTG | CATCGAAGGC | 5350 |
| ValSerValA | laAspGlyAr | gIleSerVal | ThrGlnGlyA | laSerLysAl | |
| ACTGCTGGTG | GCTGACTTTG | GACTGCAAGT | CAGCTATGAC | TGGAAGTGGC | 5400 |
| aLeuLeuVal | AlaAspPheG | lyLeuGlnVa | lSerTyrAsp | TrpAsnTrpA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GGGTAGACGT | GACGCTGCCC | AGCAGCTATC | ATGGCGCAGT | GTGCGGGCTC | 5450 |
| rgValAspVa | lThrLeuPro | SerSerTyrH | isGlyAlaVa | lCysGlyLeu | |
| TGCGGTAAAC | TGGACCGCAA | CCCCAACAA | GACCAGGTCT | TCCCTAATGG | 5500 |
| CysGlyAsnM | etAspArgAs | nProAsnAsn | AspGlnValP | heProAsnGl | |
| CACACTGGCT | CCCTCCATAC | CCATCTGGGG | CGGCAGCTGG | CGAGCCCCAG | 5550 |
| yThrLeuAla | ProSerIleP | roIleTrpGl | yGlySerTrp | ArgAlaProG | |
| GCTGGGACCC | ACTGTGTTGG | GACGAATGTC | GGGGGTCTTG | CCCAACGTGC | 5600 |
| lyTrpAspPr | oLeuCysTrp | AspGluCysA | rgGlySerCy | sProThrCys | |
| CCTGAGGACC | GGTGGAGCA | GTACGAGGGC | CCTGGCTTCT | GCGGACCCCT | 5650 |
| ProGluAspA | rgLeuGluGl | nTyrGluGly | ProGlyPheC | ysGlyProLe | |
| GGCCCCCGGC | ACAGGGGGCC | CTTTCACCAC | CTGCCATGCT | CATGTGCCAC | 5700 |
| uAlaProGly | ThrGlyGlyP | roPheThrTh | rCysHisAla | HisValProP | |
| CTGAGAGCTT | CTTCAAGGGC | TGTGTTCTGG | ACGTCTGCAT | GGGTGGTGGG | 5750 |
| roGluSerPh | ePheLysGly | CysValLeuA | spValCysMe | tGlyGlyGly | |
| GACCGTGACA | TTCTTTGCAA | GGCTCTGGCT | TCCTATGTGG | CGGCCTGCCA | 5800 |
| AspArgAspI | leLeuCysLy | sAlaLeuAla | SerTyrValA | laAlaCysGl | |
| GGCTGCTGGG | GTTGTCATCG | AAGACTGGCG | GGCACAGGTT | GGCTGTGACA | 5850 |
| nAlaAlaGly | ValValIleG | luAspTrpAr | gAlaGlnVal | GlyCysGluI | |
| TCACCTGCCC | AGAAAACAGC | CACTATGAGG | TCTGTGGCCC | ACCCTGCCCC | 5900 |
| leThrCysPr | oGluAsnSer | HisTyrGluV | alCysGlyPr | oProCysPro | |
| GCCAGCTGTC | CGTCCCCTGC | ACCCCTTACG | ACGCCAGCCG | TATGTGAGGG | 5950 |
| AlaSerCysP | roSerProAl | aProLeuThr | ThrProAlaV | alCysGluGl | |
| CCCCGTGTGTG | GAGGGCTGCC | AGTGCGACGC | GGGTTTCGTG | TTAAGTCTG | 6000 |
| yProCysVal | GluGlyCysG | lnCysAspAl | aGlyPheVal | LeuSerAlaA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ACCGCTGTGT | TCCCCTCAAC | AACGGCTGCG | GCTGCTGGGC | CAATGGCACC | 6050 |
| spArgCysVa | lProLeuAsn | AsnGlyCysG | lyCysTrpAl | aAsnGlyThr | |
| TACCACGAGG | CGGGCAGTGA | GTTTGGGGCT | GATGGCACCT | GCTCCCAGTG | 6100 |
| TyrHisGluA | laGlySerGl | uPheTrpAla | AspGlyThrC | ysSerGlnTr | |
| GTGTGGCTGC | GGGCTGGGG | GTTGGCTGCT | GGTCTGCACA | CCTGCCAGCT | 6150 |
| pCysArgCys | GlyProGlyG | lyGlySerLe | uValCysThr | ProAlaSerC | |
| GTGGGCTGGG | TGAAGTGTGT | GGCTCCTGCG | CATCCGGCCA | GCACGGCTGC | 6200 |
| ysGlyLeuGl | yGluValCys | GlyLeuLeuP | roSerGlyGl | nHisGlyCys | |
| CAGCCCGTCA | GCACAGCTGA | GTGCCAGGCG | TGGGGTGACC | CCCATTACGT | 6250 |
| GlnProValS | erThrAlaGl | uCysGlnAla | TrpGlyAspP | roHisTyrVa | |
| CACTCTGGAT | GGGCACCGAT | TCAATTTCOA | AGGCACCTGC | GAGTACCTGC | 6300 |
| lThrLeuAsp | GlyHisArgP | heAsnPheGl | nGlyThrCys | GluTyrLeuL | |
| TGAGTGACCC | CTGCCACGGA | CCACCCCTTG | GGGCTGAGAA | CTTCACTGTC | 6350 |
| euSerAlaPr | oCysHisGly | ProProLeuG | lyAlaGluAs | nPheThrVal | |
| ACTGTAGCCA | ATGAGCACCG | GGGCAGCCAG | GCTGTCAGCT | ACACCCGCAG | 6400 |
| ThrValAlaA | snGluHisAr | gGlySerGln | AlaValSerT | yrThrArgSe | |
| TGTCACCCCTG | CAAATCTACA | ACCACAGCCT | GACACTGAGT | GCCCGCTGGC | 6450 |
| rValThrLeu | GlnIleTyrA | snHisSerLe | uThrLeuSer | AlaArgTrpP | |
| CCCGGAAGCT | ACAGGTGGAC | GGCGTGTTCG | TCACTCTGCC | CTTCCAGCTG | 6500 |
| roArgLysLe | uGlnValAsp | GlyValPheV | alThrLeuPr | oPheGlnLeu | |
| GACTCGCTCC | TGCACGCACA | CCTGAGCGGC | GCCGACGTGG | TGGTGACCAC | 6550 |
| AspSerLeuL | euHisAlaHi | sLeuSerGly | AlaAspValV | alValThrTh | |
| AACCTCAGGG | CTCTCGCTGG | CTTTGACGG | GCACAGCTTC | GTGCGCCTGC | 6600 |
| rThrSerGly | LeuSerLeuA | laPheAspGl | yAspSerPhe | ValArgLeuA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GGGTGCCGGC | GGCGTACGCG | GGCTCTCTCT | GTGGCTTATG | CGGGAAGTAC | 6650 |
| rgValProAl | aAlaTyrAla | GlySerLeuC | ysGlyLeuCy | sGlyAsnTyr | |
| AACCAGGACC | CCGCAGACGA | CCTGAAGGCG | GTGGGCGGGA | AGCCCCGCGG | 6700 |
| AsnGlnAspP | roAlaAspAs | pLeuLysAla | ValGlyGlyL | ysProAlaGl | |
| ATGGCAGGTG | GGCGGCGGCC | AGGGCTGCGG | GGAATGTGTG | TCCAAGCCAT | 6750 |
| yTrpGlnVal | GlyGlyAlaG | lnGlyCysGl | yGluCysVal | SerLysProC | |
| GCCCGTGGCC | GTGCACCCCA | GAGCAGCAAG | AGTCCTTCGG | CGGCCCCGAC | 6800 |
| ysProSerPr | cCysThrPro | GluGlnGlnG | luSerPheGl | yGlyProAsp | |
| GCCTGCGGCG | TGATCTCCGC | CACCGACGGC | CCGCTGGGCG | CCTGCCACGG | 6850 |
| AlaCysGlyV | alIleSerAl | aThrAspGly | ProLeuAlaP | roCysHisGl | |
| CCTGTGTCCG | CCCGCGCAGT | ACTTCCAGGG | CTGCTTGCTG | GACGCCTGCC | 6900 |
| yLeuValPro | ProAlaGlnT | yrPheGlnGl | yCysLeuLeu | AspAlaCysG | |
| AAGTTCAGGG | CCATCCTGGA | GGCCTCTGTC | CTGCAGTGGC | CACCTACGTG | 6950 |
| lnValGlnGl | yHisProGly | GlyLeuCysP | roAlaValAl | aThrTyrVal | |
| GCAGCCTGTC | AGGCGGCTGG | GGCCCAGCTC | CGCGAGTGA | GGCGGCCGGA | 7000 |
| AlaAlaCysG | lnAlaAlaGl | yAlaGlnLeu | ArgGluTrpA | rgArgProAs | |
| CTTCTGTCCC | TTCCAGTGCC | CTGCCCACAG | CCACTACGAG | CTCTGCGGTG | 7050 |
| pPheCysPro | PheGlnCysP | roAlaHisSe | rHisTyrGlu | LeuCysGlyA | |
| ACTCCTGTCC | TGGGAGCTGC | CCGAGCCTGT | CGGCACCCCA | GGGCTGTGAG | 7100 |
| spSerCysPr | oGlySerCys | ProSerLeuS | erAlaProGl | uGlyCysGlu | |
| TGGGCTGCC | GTGAGGCTG | TGTCTGCGAT | GCTGGCTTCG | TGCTCAGTGG | 7150 |
| SerAlaCysA | rgGluGlyCy | sValCysAsp | AlaGlyPheV | alLeuSerGl | |
| TGACACGTGT | GTACCTGTGG | GCCAGTGTGG | CTGCCTCCAC | GATGACCGCT | 7200 |
| yAspThrCys | ValProValG | lyGlnCysGl | yCysLeuHis | AspAspArgT | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ACTACCCACT | GGGCCAGACC | TTCTACCCTG | GCCCTGGGTG | TGATTCCCTT | 7250 |
| yrTyrProLe | uGlyGlnThr | PheTyrProG | lyProGlyCy | sAspSerLeu | |
| TGCCGCTGCC | GGGAGGGCGG | TGAGGTGTCC | TGTGAGCCCT | CCAGCTGCGG | 7300 |
| CysArgCysA | rgGluGlyGl | yGluValSer | CysGluProS | erSerCysGl | |
| CCCCATGAG | ACCTGCCCGC | CATCCGGTGG | CAGCTTGGGC | TGCGTGGCCG | 7350 |
| yProHisGlu | ThrCysArgP | roSerGlyGl | ySerLeuGly | CysValAlaV | |
| TGGGCTCTAC | CACCTGCCAG | GCGTGGGGAG | ATCCCCACTA | CACCACCTTC | 7400 |
| alGlySerTh | rThrCysGln | AlaSerGlyA | spProHisTy | rThrThrPhe | |
| GATGGCCGCC | GCTTCGACTT | CATGGGCACC | TGGGTGTATG | TGCTGGCTCA | 7450 |
| AspGlyArgA | rgPheAspPh | eMetGlyThr | CysValTyrV | alLeuAlaGl | |
| GACCTGCGGC | ACCCGGCCTG | GCCTACATCG | GTTTGGCGTC | CTGCAGGAGA | 7500 |
| nThrCysGly | ThrArgProG | lyLeuHisAr | gPheAlaVal | LeuGlnGluA | |
| ACGTGGCCTG | GGTAATCGG | CGAGTCAGTG | TGACCAGGGT | GATCACGGTC | 7550 |
| snValAlaTr | pGlyAsnGly | ArgValSerV | alThrArgVa | lIleThrVal | |
| CAGGTGGCAA | ACTTCACCTT | GCGGCTGGAG | CAGAGACAGT | GGAAGGTCAC | 7600 |
| GlnValAlaA | snPheThrLe | uArgLeuGlu | GlnArgGlnT | rpLysValTh | |
| GGTGAACCGT | GTGGACATGA | AGCTGCCCGT | GGTGCTGGCC | AACGGCCAGA | 7650 |
| rValAsnGly | ValAspMetL | ysLeuProVa | lValLeuAla | AsnGlyGlnI | |
| TCCGTGCCTC | CCAGCATGGT | TCAGATGTTG | TGATTGAGAC | CGACTTCGGC | 7700 |
| leArgAlaSe | rglnHisGly | SerAspValV | alIleGluTh | rAspPheGly | |
| CTGCGTGTGG | CCTACGACCT | TGIGTACTAT | GTGCGGGTCA | CCGTCCCTGG | 7750 |
| LeuArgValA | laTyrAspLe | uValTyrTyr | ValArgValT | hrValProGl | |
| AACTACTAC | CAGCTGATGT | GTTGGCTGTG | TGGGAAGTAC | AACGGCGACC | 7800 |
| yAsnTyrTyr | GlnLeuMetC | ysGlyLeuCy | sGlyAsnTyr | AsnGlyAspP | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CCAAGGATGA | CTTCCAGAAG | CCCAATGGCT | CGCAGCCAGG | CAACGCCAAT | 7850 |
| roLysAspAs | pPheGlnLys | ProAsnGlyS | erGlnAlaGl | yAsnAlaAsn | |
| GAGTTCGGCA | ACTCCTGGGA | GGAGGTGGTG | CCCGACTCTC | CCTGCCTGCC | 7900 |
| GluPheGlyA | snSerTrpGl | uGluValVal | ProAspSerP | roCysLeuPr | |
| GCGGCCCAAC | TGCCCCGCGG | GGAGCGAGGG | CTGTATCCCC | ACCGAGGAGT | 7950 |
| oProProThr | CysProProG | lySerGluGl | yCysIlePro | SerGluGluC | |
| GTCCTCCCGA | GCTGGAGAAG | AAGTATCAGA | AGCAGGAGTT | CTGTGGGCTC | 8000 |
| ysProProGl | uLeuGluLys | LysTyrGlnL | ysGluGluPh | eCysGlyLeu | |
| CTCTCCAGCC | CCACAGGGCC | ACTGTCTCTC | TGCCACACAGC | TGGTGGATCC | 8050 |
| LeuSerSerP | roThrGlyPr | oLeuSerSer | CysHisLysL | euValAspPr | |
| CCAGGGTCCC | TTGAAAGATT | GCACTTTTGA | TCTCTGCCTG | GGTGGTGGGA | 8100 |
| oGlnGlyPro | LeuLysAspC | ysIlePheAs | pLeuCysLeu | GlyGlyGlyA | |
| ACCTGAGCAT | TCTCTGCAGC | AACATCCATG | CCTACGTGAG | TGCTTGGCCAG | 8150 |
| snLeuSerIl | eLeuCysSer | AsnIleHisA | laTyrValSe | rAlaCysGln | |
| GCGGCTGGAG | GCCACGTGGA | GCCCTGGAGG | AATGAAACTT | TCTGTCCCAT | 8200 |
| AlaAlaGlyG | lyHisValGl | uProTrpArg | AsnGluThrP | heCysProMe | |
| GGAATGCCCT | CAGAACAGTC | ACTACGAGCT | CTGTGCGGAC | ACCTGCTCCC | 8250 |
| tGluCysPro | GlnAsnSerH | isTyrGluLe | uCysAlaAsp | ThrCysSerL | |
| TGGGCTGCTC | GCTCTCAGT | GCCCCCTCTG | AGTGCCCCAGA | TGGGTGTGCT | 8300 |
| euGlyCysSe | rAlaLeuSer | AlaProLeuG | InCysProAs | pGlyCysAla | |
| GAGGCTGCC | AGTGTGACTC | CGGCTTCCTC | TACAACGGCC | AAGCCTGCGT | 8350 |
| GluGlyCysG | InCysAspSe | rGlyPheLeu | TyrAsnGlyG | InAlaCysVa | |
| CCCCATCCAG | CAATGTGGCT | GCTACCACAA | TGGTGCCCTAC | TATGATCCGG | 8400 |
| lProIleGln | GlnCysGlyC | ysTyrHisAs | nGlyAlaTyr | TyrGluProG | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|-------------------------|------------|-------------|-------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ACCAGACAGT | CCTCATTGAC | AACTGTCGGC | AGCA GTGCAC | GTGCCA TGCG | 8450 |
| luGlnThrVa | lLeuIle ³ sp | AsnCysArgG | lnGlnCysTh | rCysHisAla | |
| GGTAAAGTCG | TGTTGTGCCA | GCPACACAGC | TGCAAGCCGG | GGCAGGTGTG | 8500 |
| GlyLysValV | alValCysGl | nGluHisSer | CysLysProG | lyGlnValCy | |
| CCAGCCCTCC | GTAGGCATCC | TCAGCTGCCG | CACCAAGAC | CCGTGCCACG | 8550 |
| sGlnProSer | GlyGlyIleL | euSerCysVa | lThrLysAsp | ProCysHisG | |
| GGTGTACATG | CCGCCACAG | GAGACATGCA | AGGAGCAGGG | TGGCCAGGGT | 8600 |
| lyValThrCy | sArgProGln | GluThrCysL | ysGluGlnGl | yGlyGlnGly | |
| GTGTGCCTGC | CCACTATGA | GGCCACGTGC | TGGCTGTGGG | GGACCCACA | 8650 |
| ValCysLeuP | roAsnTyrGl | uAlaThrCys | TrpLeuTrpG | lyAspProHi | |
| CTACCACTCC | TTCGATGGCC | GCAAGTTTGA | CTTCCAGGGC | ACCTGTAACT | 8700 |
| sTyrHisSer | PheAspGlyA | rgLysPheAs | pPheGlnGly | ThrCysAsnT | |
| ATGTGCTGCC | AACAAC TGCC | TGCCCCGGGG | TCAGCACCCA | GGGCCTGACA | 8750 |
| yrValLeuAl | aThrThrGly | CysProGlyV | alSerThrGl | nGlyLeuThr | |
| CCCTTCACCG | TCACCACCA | GPACCAGAAC | CGGGGCAACC | CTGCTGTATC | 8800 |
| ProPheThrV | alThrThrLy | sAsnGlnAsn | ArgGlyAsnP | roAlaValSe | |
| CTACGTGAGA | GTCGTACCG | TGGCTGCCCT | CGGCACCAAC | ATCTCCATCC | 8850 |
| rTyrValArg | ValValThrV | alAlaAlaLe | uGlyThrAsn | IleSerIleH | |
| ACAAGGACGA | GATCGCCAAA | GTCCGGGTGA | ACGGTGTGCT | CACAGCCTTG | 8900 |
| isLysAspGl | uIleGlyLys | ValArgValA | snGlyValLe | uThrAlaLeu | |
| CCTGTCTCCG | TGGCCGACGG | GCGGATTTC | GTGGCCACAG | GTGCATCGAA | 8950 |
| ProValSerV | alAlaAspGl | yArgIleSer | ValAlaGlnG | lyAlaSerLy | |
| GGCACTGCTG | GTGGCTGACT | TTGGACTGCA | AGTCAGCTAT | GACTGGA ACT | 9000 |
| sAlaLeuLeu | ValAlaAspP | heGlyLeuGl | nValSerTyr | AspTrpAsnT | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GGGGGTAGA | CGTGACGCTC | CCCAGCAGCT | ATCATGGCGC | AGTGTGCGGG | 9050 |
| rpArgValAs | pValThrLeu | ProSerSerT | yrHisGlyAl | aValCysGly | |
| CTCTGGGTA | ACATGGACCG | CAACCCCAAC | AATGACCAGG | TCTTCCCTAA | 9100 |
| LeuCysGlyA | snMetAspAr | GAsnProAsn | AsnAspGlnV | aPheProAs | |
| TGGCACACTG | GCTCCCTCCA | TACCCATCTG | GGGCGGCAGC | TGGCGAGCCC | 9150 |
| nGlyThrLeu | AlaProSerI | leProIleTr | pGlyGlySer | TrpArgAlaP | |
| CAGGCTGGGA | CCCACTGTGT | TGGACCAAT | GTGGGGGGTC | CTGCCCCACG | 9200 |
| roGlyTrpAs | pProLeuCys | TrpAspGluC | ysArgGlySe | rCysProThr | |
| TGCCCTGAGG | ACCGGTGGA | GCAGTACGAG | GGCCCTGGCT | TCTGCGGACC | 9250 |
| CysProGluA | spArgLeuGl | uGlnTyrGlu | GlyProGlyP | heCysGlyPr | |
| CCTGGCCCCC | GGCACAGGGG | GGCCTTCAC | CACCTGCCAT | GCTCATGTGC | 9300 |
| oLeuAlaPro | GlyThrGlyG | lyProPheTh | rThrCysHis | AlaHisValP | |
| CACCTGAGAG | CTTCTTCAAG | GGCTGTGTTC | TGGACGTCTG | CATGGGTGGT | 9350 |
| roProGluSe | rPhePheLys | GlyCysValL | euAspValCy | sMetGlyGly | |
| GGGGACCATG | ACATTCTTTG | CAAGGCTCTG | GCTTCCTACG | TGGCCGCCTG | 9400 |
| GlyAspHisA | spIleLeuCy | sLysAlaLeu | AlaSerTyrV | alAlaAlaCy | |
| CCAGGCGGCT | GGGGTGTGCA | TGGAGACTG | GCGGGCACAG | GTTGGCTGTG | 9450 |
| sGlnAlaAla | GlyValValI | leGluAspTr | pArgAlaGln | ValGlyCysG | |
| AGATCACCTG | CCCAGAAAAC | AGCCACTATG | AGGTCTGTGG | CCCACCCTGC | 9500 |
| luIleThrCy | sProGluAsn | SerHisTyrG | luValCysGl | yProProCys | |
| CCGGCCAGCT | GTCCGTCCCC | TGCACCCCTT | ACGACGCCAG | CCGTATGTGA | 9550 |
| ProAlaSerC | ysProSerPr | oAlaProLeu | ThrThrProA | laValCysGl | |
| GGGCCCCCTG | GTGGAGGGCT | GCCAGTGCGA | CGCGGGTTTC | GTGTTAAGTG | 9600 |
| uGlyProCys | ValGluGlyC | ysGlnCysAs | pAlaGlyPhe | ValLeuSerA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CTGACCGCTG | TGTTCCCCCTC | AACAACGGCT | GCGGCTGCTG | GGCCAATGCC | 9650 |
| laAspArgCy | sValProLeu | AsnAsnGlyC | ysGlyCysTr | pAlaAsnGly | |
| ACCTACCACG | AGCGGGCCAG | TGAGTTTTGG | GCTGATGGCA | CCTGCTCCCA | 9700 |
| ThrTyrHisG | luAlaGlySe | rGluPheTrp | AlaAspGlyT | hrCysSerGl | |
| GTGGTGTGGC | TGCGGGCCTG | GGGGTGGCTC | GCTGGTCTGC | ACACCTGCCA | 9750 |
| nTrpCysArg | CysGlyProG | lyGlyGlySe | rLeuValCys | ThrProAlaS | |
| GCTGTGGGCT | GGGTGAAGTG | TGTGGCCTCC | TGCCATCCGG | CCAGCACGGC | 9800 |
| erCysGlyLe | uGlyGluVal | CysGlyLeuL | euProSerGl | yGlnHisGly | |
| TGCCAGCCCCG | TCAGCACAGC | TGAGTGGCAG | GCGTGGGGTG | ACCCCCATTA | 9850 |
| CysGlnProV | alSerThrAl | aGluCysGln | AlaTrpGlyA | spProHisTy | |
| CGTCACTCTG | GATGGGCACC | GATTGCAATT | CCAAGGCACC | TGCGAGTACC | 9900 |
| rValThrLeu | AspGlyHisA | rgPheAspPh | eGlnGlyThr | CysGluTyrL | |
| TGCTGAGTGC | ACCTTGCCAC | GGACCAACCT | TGGGGGCTGA | GACTTCACT | 9950 |
| euLeuSerAl | aProCysHis | GlyProProL | euGlyAlaGl | uAsnPheThr | |
| GTCAGTGTAG | CCAATGAGCA | CCGGGGCAGC | CAGGCTGTCA | GCTACACCCG | 10000 |
| ValThrValA | laAsnGluHi | sArgGlySer | GlnAlaValS | erTyrThrAr | |
| CAGTGTACCC | CTGCAAATCT | ACAACCCACAG | CCTGACACTG | AGTGCCCGCT | 10050 |
| gSerValThr | LeuGlnIleT | yrAsnHisSe | rLeuThrLeu | SerAlaArgT | |
| GGCCCCGGGA | GCTACAGGTG | GACGGCGTGT | TCGTCACTCT | GCCCTTCCAG | 10100 |
| rpProArgLy | sLeuGlnVal | AspGlyValP | heValThrLe | uProPheGln | |
| CTGGACTCGC | TCCTGCACGC | ACACCTGAGC | GGCGCCGACG | TGGTGGTGAC | 10150 |
| LeuAspSerL | euLeuHisAl | aHisLeuSer | GlyAlaAspV | alValValTh | |
| CACAACCTCA | GGCTCTCGC | TGGCTTTTCA | CGGGGACAGC | TTCGTGCGCC | 10200 |
| rThrThrSer | GlyLeuSerL | euAlaPheAs | pGlyAspSer | PheValArgL | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| TGCGCGTGCC | GGCGCGGTAC | GCGGCTCTC | TCTGTGGCTT | ATGCGGGAAC | 10250 |
| euArgValPr | oAlaAlaTyr | AlaGlySerL | euCysGlyLe | uCysGlyAsn | |
| TACAACCAGG | ACCCCGCAGA | CGACCTGAAG | GCGGTGGGCG | GGAAGCCCCG | 10300 |
| TyrAsnGlnA | spProAlaAs | pAspLeuLys | AlaValGlyG | lyLysProAl | |
| CGGATGGCAG | GTGGGCGGCG | CCCAGGGCTG | CGGCGAATGT | GTGTCCAAGC | 10350 |
| aGlyTyrGln | ValGlyGlyA | laGlnGlyCy | sGlyGluCys | ValSerLysP | |
| CATGCCCCGTC | GCGGTGCACC | CCAGAGCAGC | AAGAGTCCTT | CGGCGGCCCCG | 10400 |
| roCysProSe | rProCysThr | ProGluGlnG | lnGluSerPh | eGlyGlyPro | |
| GACGCTGCG | GCGTGATCTC | CGCCACCGAC | GCCCCGCTGG | CGCCCTGCCA | 10450 |
| AspAlaCysG | lyValIleSe | rAlaThrAsp | GlyProLeuA | laProCysHi | |
| CGGCTTGTG | CCGCCCCGCG | AGTACTTCCA | GCGCTGCTTG | CTGGACGCCT | 10500 |
| sGlyLeuVal | ProProAlaG | lnTyrPheGl | nGlyCysLeu | LeuAspAlaC | |
| GCCPAGTTCA | GGGCCATCCT | GGAGGCTCT | GTCCTGCAGT | GCCCCCCTAC | 10550 |
| ysGlnValGl | nGlyHisPro | GlyGlyLeuC | ysProAlaVa | lAlaThrTyr | |
| GTGGCAGCCT | GTCAGGCGCG | TGGGGCCCCAG | CTCCGCGAGT | CGAGGCGGCCC | 10600 |
| ValAlaAlaC | ysGlnAlaAl | aGlyAlaGln | LeuArgGluT | rpArgArgPr | |
| GGACTTCTGT | CCCTTCCAGT | GCCCTGCCCCA | CAGCCACTAC | GAGCTCTGCG | 10650 |
| oAspPheCys | ProPheGlnC | ysProAlaHi | sSerHisTyr | GluLeuCysG | |
| GTGACTCCTG | TCCTGGGAGC | TGCCCCGAGCC | TGTGGGCACC | CGAGGGCTGT | 10700 |
| lyAspSerCy | sProGlySer | CysProSerL | euSerAlaPr | cGluGlyCys | |
| GAGTCGGCCT | GCCGTGAAGG | CTGTGTCTGC | GATGCTGGCT | TCGTGCTCAG | 10750 |
| GluSerAlaC | ysArgGluGl | yCysValCys | AspAlaGlyP | heValLeuSe | |
| TGGTGACACG | TGTGTACCTG | TGGGCCAGTG | TGGCTGCCTC | CACGATGACC | 10800 |
| rGlyAspThr | CysValProV | alGlyGlnCy | sGlyCysLeu | HisAspAspA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GCTACTACCC | ACTGGGCCAG | ACCTTCTACC | CTGGCCCTGG | GTGTGATTCC | 10850 |
| rgTyrTyrPr | oLeuGlyGln | ThrPheTyrP | roGlyProGl | yCysAspSer | |
| CTTTGCCCGT | GCCGGGAGGG | CGGTGAGGTG | TCCTGTGAGC | CCTCCAGCTG | 10900 |
| LeuCysArgC | ysArgGluGl | yGlyGluVal | SerCysGluP | roSerSerCy | |
| CGGCCCGCAT | GAGACCTGCC | GGCCATCCGG | TGSCAGCTTG | GGCTGCGTGG | 10950 |
| sGlyProHis | GluThrCysA | rgProSerGl | yGlySerLeu | GlyCysValA | |
| CCGTGGGCTC | TACCACCTGC | CAGCGGTCCG | GAGATCCCCA | CTACACCACC | 11000 |
| laValGlySe | rThrThrCys | GlnAlaSerG | lyAspProHi | sTyrThrThr | |
| TTGATGGCC | GCCGCTTCCA | CTTCATGGGC | ACCTGGGTGT | ATGTGCTGGC | 11050 |
| PheAspGlyA | rgArgPheAs | pPheMetGly | ThrCysValT | yrValLeuAl | |
| TCAGACCTGC | GGCACCCGGC | CTGGCCTACA | TGGGTTTGCC | GTCTGTCAGG | 11100 |
| aGlnThrCys | GlyThrArgP | roGlyLeuHi | sArgPheAla | ValLeuGlnG | |
| AGAACGTGGC | CTGGGGTAAT | GGCGCAGTCA | GTGTGACCAG | GGTGATCACG | 11150 |
| luAsnValAl | aTrpGlyAsn | GlyArgValS | erValThrAr | gValIleThr | |
| GTCCAGGTGG | CAAACTTCAC | CCTGCGGCTG | GAGCAGAGAC | AGTGGPAGGT | 11200 |
| ValGlnValA | laAsnPheTh | rLeuArgLeu | GluGlnArgG | lnTrpLysVa | |
| CACGGTGAAC | GGTGTGGACA | TGAAGCTGCC | CGTGGTGCTG | GCCAACGGCC | 11250 |
| lThrValAsn | GlyValAspM | etLysLeuPr | oValValLeu | AlaAsnGlyG | |
| AGATCCGTGC | CTCCCAGCAT | GGTTCAGATG | TTGTGATTGA | GACCGACTTC | 11300 |
| lnIleArgAl | aSerGlnHis | GlySerAspV | alValIleGl | uThrAspPhe | |
| GGCCTGCGTG | TGGCCTACGA | CCTTGTGTAC | TATGTGCGGG | TCACCGTCCC | 11350 |
| GlyLeuArgV | alAlaTyrAs | pLeuValTyr | TyrValArgV | alThrValPr | |
| TGGAAACTAC | TACCAGCTGA | TGTGTGGCCT | GTGTGGGAAC | TACACCGGCG | 11400 |
| oGlyAsnTyr | TyrGlnLeuM | etCysGlyLe | uCysGlyAsn | TyrAsnGlyA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ACCCCAAGGA | TGACTTCCAG | AAGCCCAATG | GCTCGCAGGC | AGGCAACGCC | 11450 |
| spProLysAs | pAspPheGln | LysProAsnG | lySerGlnAl | aGlyAsnAla | |
| AATGAGTTCG | GCAACTCCTG | GGAGGAGGTG | GTGCCCAGCT | CTCCCTGCCT | 11500 |
| AsnGluPheG | lyAsnSerTr | pGluGluVal | ValProAspS | erProCysLe | |
| GCCGCCGCC | ACCTGCCCGC | CGGGGAGCGA | GGCTGTATC | CCCAGCGAGG | 11550 |
| uProProPro | ThrCysProP | roGlySerGl | uGlyCysIle | ProSerGluG | |
| AGTGTCTCC | CGAGCTGGAG | AAGAAGTATC | AGAAGGAGGA | GTCTGTGGG | 11600 |
| luCysProPr | cGluLeuGlu | LysLysTyrG | lnLysGluGl | uPheCysGly | |
| CTCTCTCCA | GCCCCACAGG | GCCACTGTCC | TCTGCCACA | AGCTGGTGGA | 11650 |
| LeuLeuSerS | erProThrGl | yProLeuSer | SerCysHisL | ysLeuValAs | |
| TCCCCAGGGT | CCCTTGAAG | ATTGCATCTT | TGATCTCTGC | CTGGGTGGTG | 11700 |
| pProGlnGly | ProLeuLysA | spCysIlePh | eAspLeuCys | LeuGlyGlyG | |
| GGAACCTGAG | CATTCTCTGC | AGCAACATCC | ATGCCTACGT | GAGTGCTTGC | 11750 |
| lyAsnLeuSe | rIleLeuCys | SerAsnIleH | isAlaTyrVa | lSerAlaCys | |
| CAGCGGGCTG | GAGGCCACGT | GGAGCCCTGG | AGGAATGAAA | CTTTCTGTCC | 11800 |
| GlnAlaAlaG | lyGlyHisVa | lGluProTrp | ArgAsnGluT | hrPheCysPr | |
| CATGGAATGC | CCTCAGAACA | GTCACTACGA | GCTCTGTGCG | GACACCTGCT | 11850 |
| oMetGluCys | ProGlnAsnS | erHisTyrGl | uLeuCysAla | AspThrCysS | |
| CCCTGGGCTG | CTCGGCTCTC | AGTGCCCTTC | TGCAGTGCCC | AGATGGGTGT | 11900 |
| erLeuGlyCy | sSerAlaLeu | SerAlaProL | euGlnCysPr | oAspGlyCys | |
| GCTGAGGCT | GCCAGTGTA | CTCCGGCTTC | CTCTACACCG | GCCPAGCCTG | 11950 |
| AlaGluGlyC | ysGlnCysAs | pSerGlyPhe | LeuTyrAsnG | lyGlnAlaCy | |
| CGTGCCCATC | CAGCAATGTG | GCTGCTACCA | CAATGGTGTC | TACTATGAGC | 12000 |
| sValProIle | GlnGlnCysG | lyCysTyrHi | sAsnGlyVal | TyrTyrGluP | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CGGAGCAGAC | AGTCCTCATT | GACAACTGTC | GGCAGCAGTG | CACGTGCCAT | 12050 |
| rcGluGlnTh | rValLeuIle | AspAsnCysA | rgGlnGlnCy | sThrCysHis | |
| GTGGGTAAAG | TCGTGGTG | CCAGGACAC | AGCTGCAAGC | CGGGGCAGGT | 12100 |
| ValGlyLysV | alValValCy | sGlnGluHis | SerCysLysP | rcGlyGlnVa | |
| GTGCCAGCCC | TCCGGAGGCA | TCCTGAGGTG | CGTCAACAAA | GACCCGTGCC | 12150 |
| lCysGlnPro | SerGlyGlyI | leLeuSerCy | sValAsnLys | AspProCysH | |
| ACGGCGTGAC | ATGCCGGCCA | CAGGAGACAT | GCAAGGAGCA | GGGTGGCCAG | 12200 |
| isGlyValTh | rCysArgPro | GlnGluThrC | ysLysGluGl | nGlyGlyGln | |
| GGTGTGTGCC | TGCCCCACTA | TGAGGCCACG | TGCTGGCTGT | GGGGCGACCC | 12250 |
| GlyValCysL | euProAsnTy | rGluAlaThr | CysTrpLeuT | rpGlyAspPr | |
| ACACTACCAC | TCCTTCGATG | GCCGGAAGTT | TGACTTCCAG | GGCACCTGTA | 12300 |
| oHisTyrHis | SerPheAspG | lyArgLysPh | eAspPheGln | GlyThrCysA | |
| ACTATGTGCT | GGCAACAAC | GGCTGCCCGG | GGGTCAGCAC | CCAGGGCCTG | 12350 |
| snTyrValLe | uAlaThrThr | GlyCysProG | lyValSerTh | rGlnGlyLeu | |
| ACACCCCTTCA | CCGTCACCAC | CAAGPACCAG | AACCGGGGCA | ACCCTGCTGT | 12400 |
| ThrProPheT | hrValThrTh | rLysAsnGln | AsnArgGlyA | snProAlaVa | |
| ATCCTACGIG | AGAGTCGTCA | CCGTGGCTGC | CCTCGGCACC | AACATCTCCA | 12450 |
| lSerTyrVal | ArgValValT | hrValAlaAl | aLeuGlyThr | AsnIleSerI | |
| TCCACAGGA | CGAGATCGGC | AAAGTCCGGG | TGACCGGTGT | GCTCACAGCC | 12500 |
| leHisLysAs | pGluIleGly | LysValArgV | alAsnGlyVa | lLeuThrAla | |
| TTGCCTGTCT | CCGTGGCCGA | CGGGCGGATT | TCAGTGGCCC | AGGGTGCAATC | 12550 |
| LeuProValS | erValAlaAs | pGlyArgIle | SerValAlaG | lnGlyAlaSe | |
| GAAEGCACTG | CTGGTGGCTG | ACTTTGGACT | GCAAGTCAGC | TATGACTGCA | 12600 |
| rLysAlaLeu | LeuValAlaA | spPheGlyLe | uGlnValSer | TyrAspTrpA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|-------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ACTGGCGGGT | AGACGTGACG | CTCCCCAGCA | GCTATCATGG | CGCAGTGTGC | 12650 |
| snTrpArgVa | lAspValThr | LeuProSerS | erTyrHisGl | yAlaValCys | |
| GGGCTCTGCG | GTAACATGGA | CCGCAACCCC | AACAATGACC | AGGTCTTCCC | 12700 |
| GlyLeuCysG | lyAsnMetAs | pArgAsnPro | AsnAsnAspG | lnValPhePr | |
| TTATGGCACA | CTGGCTCCCT | CCATACCCCT | CTGGCGCGGC | AGCTGGCGAG | 12750 |
| oAsnGlyThr | LeuAlaProS | erIleProIl | eTrpGlyGly | SerTrpArgA | |
| CCCCAGGCTG | GGACCCACTG | TGTTGGGACG | AATGTGCGGG | GTCTTGCCCA | 12800 |
| laProGlyTr | pAspProLeu | CysTrpAspG | luCysArgGl | ySerCysPro | |
| ACGTGCCCTG | AGGACCGGTT | GGAGCAGTAC | GAGGGCCCTG | GCTTCTGCGG | 12850 |
| ThrCysProG | luAspArgLe | uGluGlnTyr | GluGlyProG | lyPheCysGl | |
| ACCCCTGGCA | TCTGGCACAG | GGGGCCCCCT | CACCACCTGC | CATGCTCATG | 12900 |
| yProLeuAla | SerGlyThrG | lyGlyProPh | eThrThrCys | HisAlaHisV | |
| TGCCACCTGA | GAGCTTCTTC | AAGGGCTGTG | TCTTGGACGT | CTGCAITGGT | 12950 |
| alProProGl | uSerPhePhe | LysGlyCysV | alLeuAspVa | lCysMetGly | |
| GGTGGGGACC | ATGACATTCT | TTGCAAGGCT | CTGGCTTCCT | ACGTGGCCGC | 13000 |
| GlyGlyAspH | isAspIleLe | uCysLysAla | LeuAlaSerT | yrValAlaAl | |
| CTGCCAGGCC | GCTGGGGTTG | TCATCGAAGA | CTGGCGGGCA | CAGGTGGGCT | 13050 |
| aCysGlnAla | AlaGlyValV | alIleGluAs | pTrpArgAla | GlnValGlyC | |
| GTGAGATCAC | CTGCCCAGAA | AACACCCACT | ATGAGGTCTG | TGGCCCCACCC | 13100 |
| ysGluIleTh | rCysProGlu | AsnSerHisT | yrGluValCy | sGlyProPro | |
| TGCCCCGGCA | GCTGTCCGTC | CCCTGCACCC | CTTACGACGC | CAGCCGTATG | 13150 |
| CysProAlaS | erCysProSe | rProAlaPro | LeuThrThrP | roAlaValCy | |
| TGAGGGCCCC | TGTGTGGAGG | GCTGCCAGTG | CGACGCGGGT | TTCGTGTTAA | 13200 |
| sGluGlyPro | CysValGluG | lyCysGlnCy | sAspAlaGly | PheValLeuS | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GTGCTGACCG | CTGIGTTCCC | CTCAACAACG | GCTGCGGCTG | CTGGGCCAAT | 13250 |
| erAlaAspAr | gCysValPro | LeuAsnAsnG | lyCysGlyCy | sTrpAlaAsn | |
| GGCAGCTACC | ACGAGGGGGG | CAGTGAATTT | TGGGCTGATG | GCACCTGCTC | 13300 |
| GlyThrTyrH | isGluAlaGl | ySerGluPhe | TrpAlaAspG | lyThrCysSe | |
| CCAGTGGTGT | CGCTGCGGGC | CTGGGGGTGG | CTCGCTGGTC | TGCACACCTG | 13350 |
| rGlnTrpCys | ArgCysGlyP | roGlyGlyGl | ySerLeuVal | CysThrProA | |
| CCAGCTGTGG | GCTGGGTGAA | GTGTGTGGCC | TCCTGCCATC | CGGCCAGCAC | 13400 |
| laSerCysGl | yLeuGlyGlu | ValCysGlyL | euLeuProSe | rGlyGlnHis | |
| AGCTGCCAGC | CCGTCAGCAC | AGCTGAGTGC | CAGGCGTGGG | GTGACCCCCA | 13450 |
| SerCysGlnP | roValSerTh | zAlaGluCys | GlnAlaTrpG | lyAspProHi | |
| TTACGTCACT | CTGGATGGGC | ACCGATTCCA | TTTCCAAGGC | ACCTGCGAGT | 13500 |
| sTyrValThr | LeuAspGlyH | isArgPheAs | pPheGlnGly | ThrCysGluT | |
| ACCTGCTGAG | TGCACCTGCG | CACGGACCAC | CCTTGGGGGC | TCAGAACTTC | 13550 |
| yrLeuLeuSe | rAlaProCys | HisGlyProp | roLeuGlyAl | aGluAsnPhe | |
| ACTGTCACTG | TAGCCAAATGA | GCACCGGGGC | AGCCAGGCTG | TCAGCTACAC | 13600 |
| ThrValThrV | alAlaAsnGl | uHisArgGly | SerGlnAlaV | alSerTyrTh | |
| CCGCAGTGTC | ACCGTGCAAA | TCTACAACCA | CAGCCTGACA | CTGAGTGCCC | 13650 |
| rArgSerVal | ThrLeuGlnI | leTyrAsnHi | sSerLeuThr | LeuSerAlaA | |
| GCTGGCCCCG | GAGGCTACAG | GTCCAGGGCG | TGTTCTGTGG | TCTGCCCTTC | 13700 |
| rgTrpProAr | gLysLeuGln | ValAspGlyV | alPheValAl | aLeuProPhe | |
| CAGCTGGACT | CGCTCCTGCA | CGCACACCTG | AGCGGCGCCG | ACGTGGTGGT | 13750 |
| GlnLeuAspS | erLeuLeuHi | sAlaHisLeu | SerGlyAlaA | spValValVa | |
| GACCAACAACC | TCAGGGCTCT | CGCTGGCTTT | CGATGGGGAC | AGCTTCGTGC | 13800 |
| lThrThrThr | SerGlyLeuS | erLeuAlaPh | eAspGlyAsp | SerPheValA | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|-------------|------------|------------|---------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GCCTGCGCGT | GCCGCGCGCG | TACGCGGCTT | CTCTCTGTGG | CTTATGCGGG | 13850 |
| rgLeuArgVa | lProAlaAla | TyrAlaAlaS | erLeuCysGl | yLeuCysGly | |
| AACTACAACC | AGGACCCCGC | AGACGACCTG | AAGCTGTGTG | GCGGGAAGCC | 13900 |
| AsnTyrAsnG | lnAspProAl | aAspAspLeu | LysAlaValG | lyGlyLysPr | |
| CGCTGGATGG | CAGGTGGGCG | GGGCCCAGGG | CTGCGGGGAA | TGTGTGTCCA | 13950 |
| oAlaGlyTrp | GlnValGlyG | lyAlaGlnGl | yCysGlyGlu | CysValSerL | |
| AGCCATGCCC | GTGCGGTGTC | ACCCGAGAGC | AGCAGGAGTC | CTTCGGCGGC | 14000 |
| ysProCysPr | oSerProCys | ThrProGluG | lnGlnGluSe | rPheGlyGly | |
| CCGGACGCTT | GCGGCGTGAT | CTCCGCCACC | GACGCGCCGC | TGGCACCCCTG | 14050 |
| ProAspAlaC | ysGlyValIl | eSerAlaThr | AspGlyProL | euAlaProCy | |
| CCACGGCCTT | GTGCGGCCCC | CGCAGTACTT | CCAGGGCTGC | TTGCTGGACG | 14100 |
| sHisGlyLeu | ValProProA | laGlnTyrPh | eGlnGlyCys | LeuLeuAspA | |
| CCTGCCAAGT | TCAGGGCCAT | CCTGGAGGCC | TCTGTCTCTG | AGTGGCTACC | 14150 |
| laCysGlnVa | lGlnGlyHis | ProGlyGlyL | euCysProAl | aValAlaThr | |
| TACGTGGCAG | CTGTTCAGGC | CGCTGGGGCC | CAGCTCGGCG | AGTGGAGGCG | 14200 |
| TyrValAlaA | laCysGlnAl | aAlaGlyAla | GlnLeuGlyG | luTrpArgAr | |
| GCCGGACTION | TGTCCCTTGC | AGTGCCTCTG | CCACAGCCAC | TATGAGCTCT | 14250 |
| gProAspPhe | CysProLeuG | lnCysProAl | aHisSerHis | TyrGluLeuC | |
| GCGGTGACTC | CTGCCCCTGTG | AGCTGCCCGA | GCCTCTCAGC | ACCCGAGGGC | 14300 |
| ysGlyAspSe | rCysProVal | SerCysProS | erLeuSerAl | aProGluGly | |
| TGTGAGTCGG | CCTGCCGTGA | AGGCTGTGTC | TGCGATGCTG | GCTTCGTACTION | 14350 |
| CysGluSerA | laCysArgGl | uGlyCysVal | CysAspAlaG | lyPheValLe | |
| CAGTGGTGAC | ACCTGCGTAC | CCGTGGGCCC | GTGTGGCTGC | CTCCATGATG | 14400 |
| uSerGlyAsp | ThrCysValP | roValGlyGl | nCysGlyCys | LeuHisAspG | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| CCCCGCTACTA | CCCACTGGGC | GAGGTCTTCT | ACCCGGGGCC | TCAGTGTGAG | 14450 |
| lyArgTyrTy | rProLeuGly | GluValPheT | yrProGlyPr | cGluCysGlu | |
| CGACGCTGTG | AGTGTGGGC | AGGTGGCCAT | GTCACCTGCC | AGGAGGGCGC | 14500 |
| ArgArgCysG | luCysGlyPr | cGlyGlyHis | ValThrCysG | lnGluGlyAl | |
| AGCCTGTGGG | CCCCATGAGG | AGTGCCGGTT | AGAGGATGGT | GTCCAGGCCT | 14550 |
| aLaCysGly | ProHisGluG | luCysArgLe | uGluAspGly | ValGlnAlaC | |
| GTCATGCCAC | AGGCTGTGGC | CGCTGCCTGG | CCACGGGGGG | CATCCACTAC | 14600 |
| ysHisAlaTh | rGlyCysGly | ArgCysLeuA | laAsnGlyGl | yIleHisTyr | |
| ATCACCCCTTG | ATGGCCGIGT | CTACGACCTG | CATGGCTCCT | GCTCCTATGT | 14650 |
| IleThrLeuA | spGlyArgVa | lTyrAspLeu | HisGlySerC | ysSerTyrVa | |
| CTTGGCCCAA | GTCTGCCACC | CAGAGCCTGG | GGACGAGGAC | TTTTCCATCG | 14700 |
| lLeuAlaGln | ValCysHisP | roLysProGl | yAspGluAsp | PheSerIleV | |
| TGCTTGAGAA | GAATGCAGCT | GGACATCTCC | AACGCCTCCT | GGTTACTGTG | 14750 |
| alLeuGluLy | sAsnAlaAla | GlyHisLeuG | lnArgLeuLe | uValThrVal | |
| GCTGGCCAGG | TTGTGAGCCT | AGCTCAGGGG | CAGCAGGTCA | CCGTGGACCG | 14800 |
| AlaGlyGlnV | alValSerLe | uAlaGlnGly | GlnGlnValT | hrValAspGl | |
| CGAGGCTGTG | GGCCTGCCTG | TGGGTGTGGG | CCGGTGGCGG | GTGACCGCCG | 14850 |
| yGluAlaVal | AlaLeuProV | alAlaValGl | yArgValArg | ValThrAlaG | |
| AGGGCCGAAA | CAATGGTTCTG | CAGACGACCA | AGGGGCTGCG | GCTTCTCTTT | 14900 |
| luGlyArgAs | nMetValLeu | GlnThrThrL | ysGlyLeuAr | gLeuLeuPhe | |
| GATGGCGATG | CCCACCTCCT | CATGTCCATC | CCCAGCCCCCT | TCCGTGGACG | 14950 |
| AspGlyAspA | laHisLeuLe | uMetSerIle | ProSerProP | heArgGlyAr | |
| GCTCTGTGGC | CTCTGTGGGA | ACTTCAATGG | CAACTGGAGT | GACCACTTTG | 15000 |
| gLeuCysGly | LeuCysGlyA | snPheAsnGl | yAsnTrpSer | AspAspPheV | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| TCCTGCCCCA | TGGCTCAGCA | GCGTCCAGTG | TGGAGACCTT | CGGGGCTGCA | 15050 |
| alLeuProAs | nGlySerAla | AlaSerSerV | alGluThrPh | eGlyAlaAla | |
| TGGCGGGTGC | CCGGCTCCTC | CAAGGGCTGT | GGCGAGGGCT | CGGGGCCCCA | 15100 |
| TrpArgValP | roGlySerSe | rLysGlyCys | GlyGluGlyC | ysGlyProGl | |
| AGGCTGCCCC | GTGTGCTTGG | CAGAGGAGAC | TGCAACCTAT | GAGAGCAACG | 15150 |
| nGlyCysPro | ValCysLeuA | laGluGluTh | rAlaProTyr | GluSerAsnG | |
| AGGCCTGCGG | GCAGCTCCGG | AACCCCCAGG | GCCCCCTTCG | GACCTGCCAG | 15200 |
| luAlaCysGl | yGlnLeuArg | AsnProGlnG | lyProPheAl | aThrCysGln | |
| GCGGTGCTGA | GTCCCTCTGA | GTACTTCCGC | CAATGCGTAT | ACGACCTGTG | 15250 |
| AlaValLeuS | erProSerGl | uTyrPheArg | GlnCysValT | yrAspLeuCy | |
| CGCGCAAAAG | GGTGACAAAG | CCTTCCTGTG | CCGCAGCCTG | GCAGCCTACA | 15300 |
| sAlaGlnLys | GlyAspLysA | laPheLeuCy | sArgSerLeu | AlaAlaTyrT | |
| CGGCGGCCTG | TCAGGCAGCT | GCGGTGGCCG | TGAGGCCCTG | GAGGACAGAC | 15350 |
| hrAlaAlaCy | sGlnAlaAla | GlyValAlaV | alLysProTr | pArgThrAsp | |
| AGCTTCTGCC | CGCTCCATTG | CCCCGCCCCA | AGCCACTACT | CCATCTGCAC | 15400 |
| SerPheCysP | roLeuHisCy | sProAlaHis | SerHisTyrS | erIleCysTh | |
| TGGCACCTGC | CAGGGATCCT | GTGCGGCTCT | CTCCGGCCTC | ACGGGCTGCA | 15450 |
| rArgThrCys | GlnGlySerC | ysAlaAlaLe | uSerGlyLeu | ThrGlyCyst | |
| CCACCCGCTG | TTTGTAGGGC | TGTGAGTGCG | ACGACCGCTT | CCTGCTTTCC | 15500 |
| hrThrArgCy | sPheGluGly | CysGluCysA | spAspArgPh | eLeuLeuSer | |
| CAGGGTGTCT | GCATCCCTGT | CCAGATTGT | GGCTGCACCC | ATAATGGCCG | 15550 |
| GlnGlyValC | ysIleProVa | lGlnAspCys | GlyCysThrH | isAsnGlyAr | |
| ATACTTGCCG | GTAAACTCCT | CCCTGCTGAC | CTCAGACTGC | AGCGAGCGCT | 15600 |
| gTyrLeuPro | ValAsnSerS | erLeuLeuTh | rSerAspCys | SerGluArgC | |

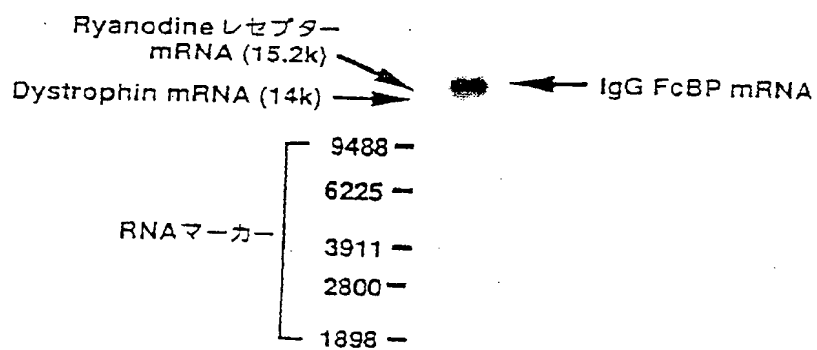
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| GTTCCTGTTC | CTCAAGCTCT | GGCCTGACAT | GCCAGGCCCGC | TGGCTGCCCA | 15650 |
| ysSerCysSe | rSerSerSer | GlyLeuThrC | ysGlnAlaAl | aGlyCysPro | |
| CCAGGCCGTG | TATGTGAGGT | CAAGGCTGAA | CCCCGGAACT | GCTGGGCCAC | 15700 |
| ProGlyArgV | alCysGluVa | lLysAlaGlu | AlaArgAsnC | ysTrpAlaTh | |
| CCGTGGTCTC | TGTGTCTGT | CTGTGGGTGC | CAACCTCACC | ACCTTTGATG | 15750 |
| rArgGlyLeu | CysValLeuS | erValGlyAl | aAsnLeuThr | ThrPheAspG | |
| GGGCCCCGTG | TGCCACCACC | TCTCCTGGTG | TCTATGAGCT | CTCTTCCCCG | 15800 |
| lyAlaArgGl | yAlaThrThr | SerProGlyV | alTyrGluLe | uSerSerArg | |
| TGCCCCAGGAC | TACAGAATAC | CATCCCCCTGG | TACCGTGTAG | TTGCCGAAGT | 15850 |
| CysProGlyL | euGlnAsnTh | rIleProTrp | TyrArgValV | alAlaGluVa | |
| CCAGATCTGC | CATGGCAAAA | CGGAGGCTGT | GGGCCAGGTC | CACATCTTCT | 15900 |
| lGlnIleCys | HisGlyLysT | hrGluAlaVa | lGlyGlnVal | HisIlePheP | |
| TCCAGGATGG | GATGGTGACG | TTGACTCCAA | ACAAGGGTGT | GTGGGTCAAT | 15950 |
| heGlnAspGl | yMetValThr | LeuThrProA | snLysGlyVa | lTrpValAsn | |
| GGTCTCCGAG | TGGATCTCCC | AGCTGAGAAG | TTAGCATCTG | TGTCCGTGAG | 16000 |
| GlyLeuArgV | alAspLeuPr | oAlaGluLys | LeuAlaSerV | alSerValSe | |
| TCGTACACCT | GATGGCTCCC | TGCTAGTCCG | CCAGAAGGCA | GGGGTCCAGG | 16050 |
| rArgThrPro | AspGlySerL | euLeuValAr | gGlnLysAla | GlyValGlnV | |
| TGTGGCTTGG | AGCCAATGGG | AAGGTGGCTG | TGATTGTCAG | CPATGACCAT | 16100 |
| alTrpLeuGl | yAlaAsnGly | LysValAlaV | alIleValSe | rAsnAspHis | |
| GCTGGGAAAC | TGTGTGGGGC | CTGTGGAAAC | TTTGACGGGG | ACCAGACCAA | 16150 |
| AlaGlyLysL | euCysGlyAl | aCysGlyAsn | PheAspGlyA | spGlnThrAs | |
| TGATTGCCAT | CACTCCCAGG | AGAAGCCAGC | GATGCAGAAA | TGCAGACCGC | 16200 |
| nAspTrpHis | AspSerGlnG | luLysProAl | aMetGluLys | TrpArgAlaG | |

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| AGGACTTCTC | CCCATGTTAT | GGCTGATCAG | TCATCCACCA | GGAACGAAGA | 16250 |
| lnAspPheSe | rProCysTyr | Gly | | | |
| TTTCCTGAG | AAGACCTGGT | CCCTCTGGAG | GTTCGGGTGG | CTGAAGGATG | 16300 |
| CATCATGTGC | TCCTACCCCTG | CTCTACCGGT | TTTCTGGGTC | ACAGAGGCCA | 16350 |
| AATGTGAGAG | CATTGAATAA | ATATCTTAAG | CT | | 16382 |

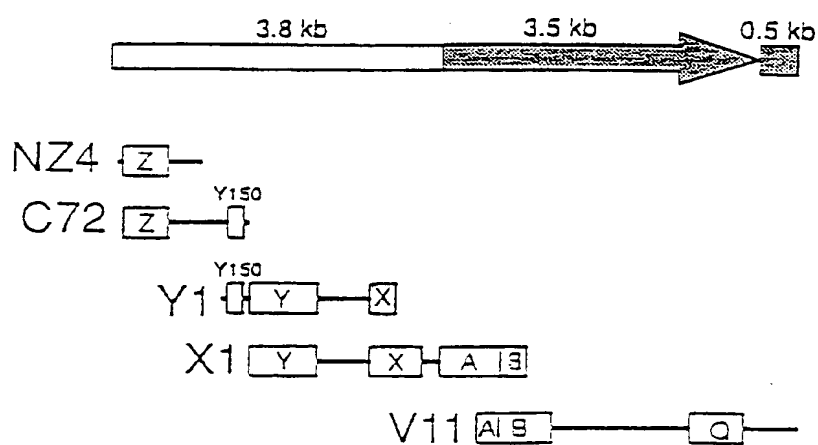
請求の範囲

1. 配列表の配列番号6に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれを一部置換、欠失もしくは付加した塩基配列、あるいはこれらにハイブリダイズする塩基配列を含むDNAおよびそのDNA断片。
2. プラスミドpNV11-ST（生命研条寄第4625号：FERM BP
5 -4625）中に挿入されている請求項1記載のDNAおよびそのDNA断片。
3. 配列表の配列番号7に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれを一部置換、欠失もしくは付加した塩基配列、あるいはこれらにハイブリダイズする塩基配列を含むDNAおよびそのDNA断片。
4. 請求項1または3記載のDNAまたはそのDNA断片を含有する組換えベ
10 クター。
5. 請求項4記載の組換えベクターにより形質転換された原核または真核宿主細胞。
6. 請求項5記載の宿主細胞を培養し、産生されたタンパク質を分離、精製することを特徴とする組換えタンパク質の製造方法。
- 15 7. 組換えタンパク質がIgGFc部結合活性を示す請求項6記載の組換えタンパク質の製造方法。
8. 請求項5記載の宿主細胞を培養して得られる培養物を細胞内または細胞外から分離、精製して得られる組換えIgGFc部結合活性を示すタンパク質。
9. 請求項1または3記載のDNAまたはそのDNA断片をプローブとして用
20 いて、ノーザンブロット解析またはインサイチュハイブリダイゼーション法によってIgGFc部結合タンパク質のmRNAの合成組織を同定する方法。

第 1 図



第 2 図

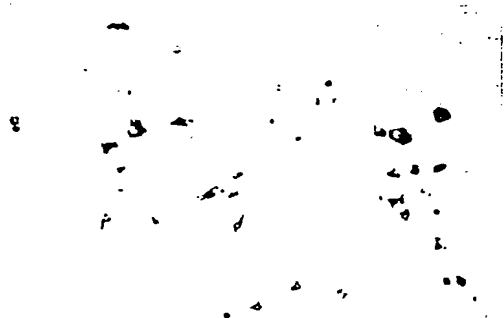


第 3 図

A



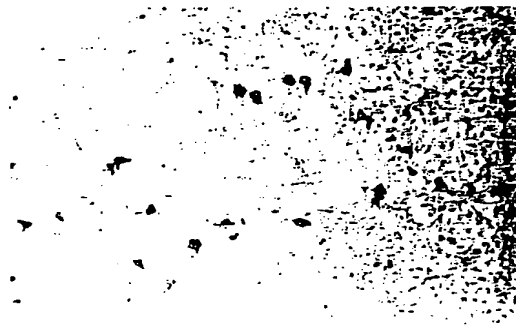
B.



C.

第 4 図

A.



B.



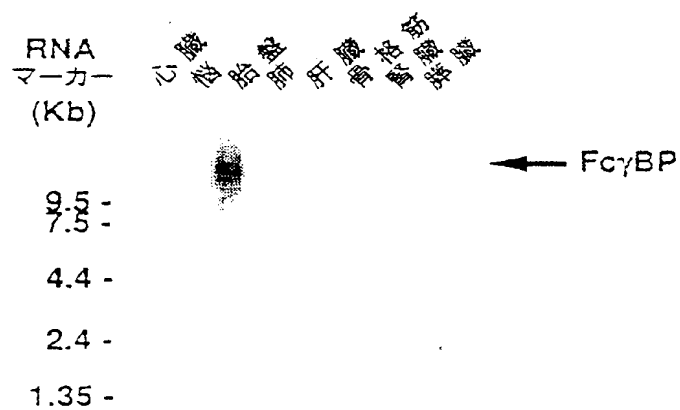
C.



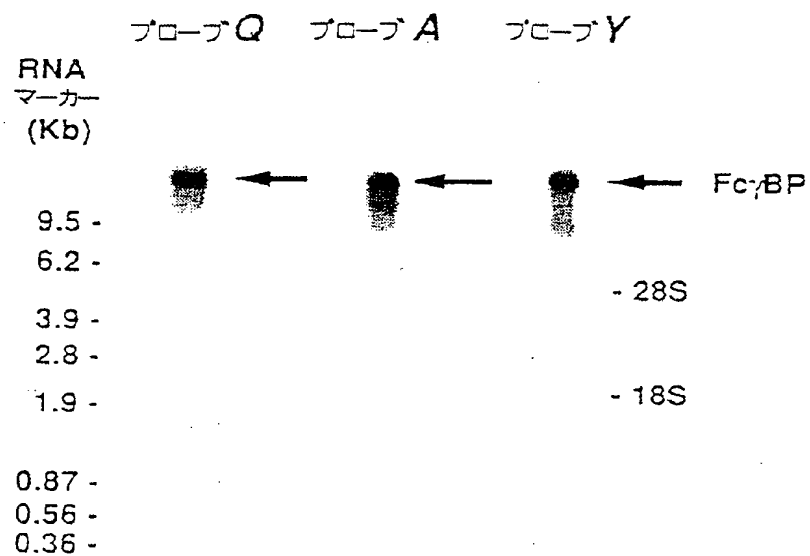
第 5 図



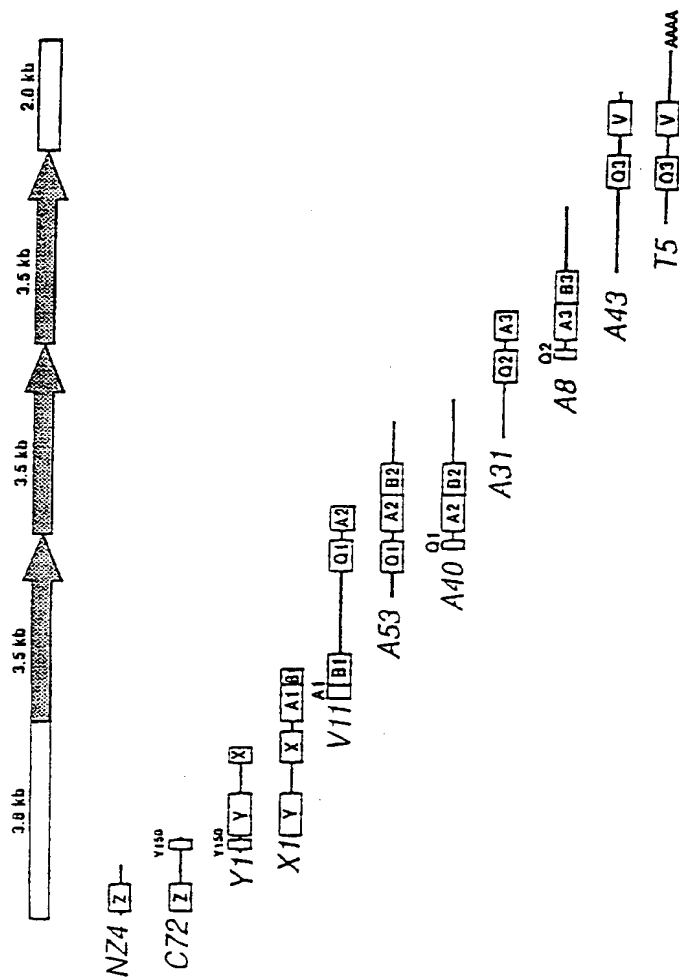
第 6 図



第 7 図

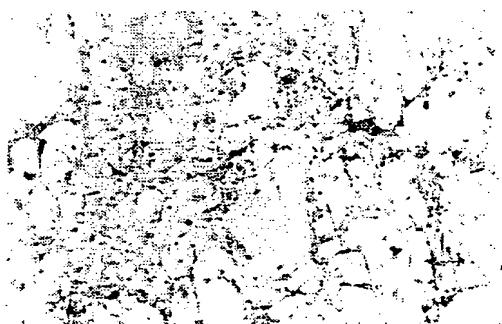


第 8 図

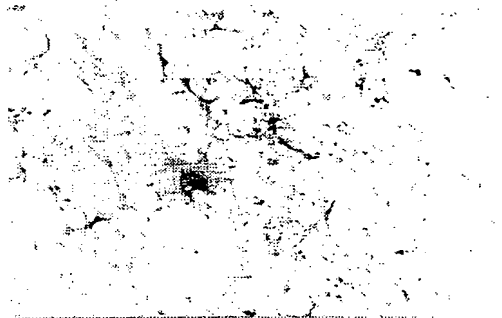


第 9 図

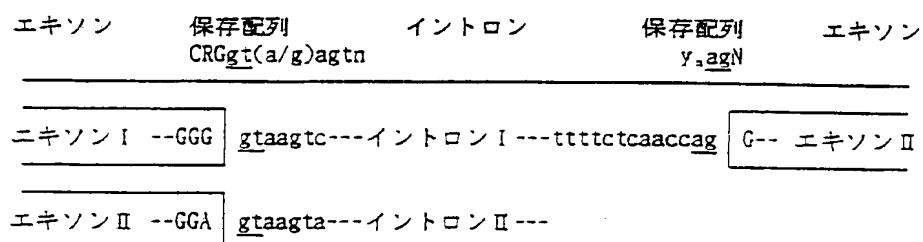
A.



B.



第 10 図

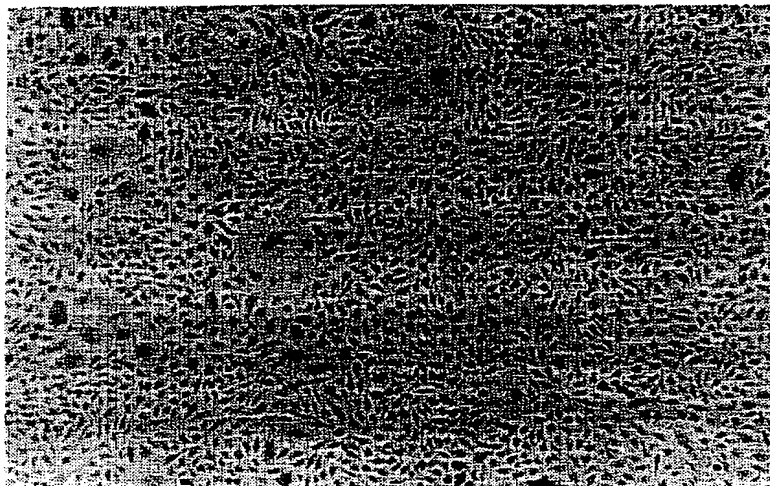


第 11 図

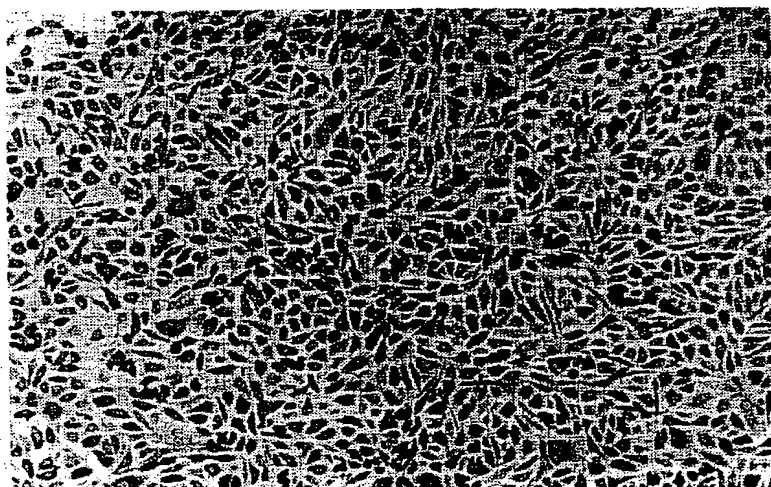
-----GGATCATACCCCTGGCCCATCTGCCGACTTCTTTCCCACTCAGCCTTCAT
 GGTCCAGGTGGCCCTTGTATGACAGTGGGCCCTTCTGCCAGGACAGTCTCCAGCAGGCGGTGGAATCAGCCTTCTATGATCCTTTCTCTTTCTTA
 CTGCAGCCATGGGTGCCCTATGGAGCTGGTGGATACCTTGGCTGGAGCAACCTCTCTGTGGGtaagtcagaccagaccctctccatgtccctgttcc
 aatctgggaaccttgctgggtccacgcttccatgtgtgctccctccacatgtcaccctggc tagctgagacagagagaggcccttaggcctgtgca
 ggaggaatgtggtagaattc-----Kb-----
 -----tgcctggcccatcagcatggagttttagggccctgtctaaagggttttagatttttgaanaac
 aaaagccaggaaggctttagacgaaggctgcatgaa tcagaagaagggaagagaagggtgttggggaaggcccaagttatcttcaacatgtttct
 gggtagagagcaaaagtggggaggattgga taagtggaccacacatgtat ttttcaaccagGATTGACCCAGGAGGCTTCAGTGGACCTCAAGAACAC
 101 TGGCAGAGGGAATTCTCAGCCCTTCTGCAGAACTATCAGCTGGCTACAGCAAGGCTTCCCCGCTCTTATCTCCAGTCTGTACAGAGCCCC
 201 GCTTCAGTCTCCATCTCAGCCAGGCAGACAACCTCAAGAAGGTCAAGTGAAGCCGGGAGTCTGGTCAATCATCAGTGCACAGGCTGAGA
 301 TGA TAGGCAGCAAGATCTTCCAGCATGGGTGGTGA TCCATTCTGACTATGCCATCTCTGTGCAGGCAGTAAATGCCAAGCTGACACAGCGAGCTGAC
 401 ACTGCTGCGGCCATCCAGGCCCTAGGCACCGAGTATTTGTGCTCACACCCCGGCCACTCAGCCAGGAATGTCAAGGAGTTGCCGTGGTGGCGGT
 501 GCCCAGGTGCTCTGGTCACTGCTGAGGGGTCACTGACA TCCATGGCAAGTCTATCCAGCAGGCGATGCTTAAGAGTGACTCTACAGCCCT
 601 ACAATGTGCCCAAGCTACAGAGCTCAGTGGATCTCTCGGGTCAGAGTCAAGCTACAGCTAGTAGCCCGTGGCTGTCTCTGCGCCACAGCTGTGCGCAGAA
 701 ACATACGACCTGCAACCATGTGGTGGAGCAGCTGCTACCCAGTCTGGCTGGGCCACCCACTATGTAGTACCCAGCTGGCTCCCAATCTCGCTATGAT
 801 TTGGCCTTCGTTGTGGCCAGCCAGGCCACAAAGCTGACCTACACCATGGGGTATCACTGGCTCCCGTGGGCTCCAGGCAGGTGATGTGGTAGAGTTG
 901 AGGTCCGGCATCTCTGCCACTCTACCTGTCTGCAAAATGTGGGCA TCCAGTCTCTGTTTGGCA CAGGTGCCATAAGGAATGAAGTGACTTATGACCC
 1001 CTACCTGGTCTGTATCCAGATGTGGCGGCTACTGCCAGCCTATGTGGTCAAGAGTGTACAGGCTGTGAGGGCGTGGCCCTGGTAGTGGCAGAGCG
 1101 AAGGCTATCAGCGGCTGACCATAGATGGGCA TGCAGTGGGGCCAGCTCACCTGGGAGGCTGTGCCAGGCAAGTGTCTGCTATGCTGAAGTGGAGC
 1201 TCGGCACAGCTGACATGATCCACAGGCGGAGGCCACCACTTGGGCTGCTCACCTTCGGGCTGGCCAGGCTATAGGCTACGCAACAGCTGCTGA
 1301 TTGGGCGCCGAGtaagtaatggaaa tgtccctgggtccctgtgacccgttttccaccacc tacctctgtggctttcgga tccctgatgt
 tccctccctccactctctctcccgacatccctcccaagcttctccagccctccca tccgcccagaacaa tttctaaa ttttagcaaccaggga
 gagctggggcac taccg tcagaagagacagcagccaaagcac tggacagggtcc tgaagcccca tca tctggca tcagccctgtctgttggtttg
 tttcgaaagggtcc-----

第 13 図

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00638

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁶ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/735, C12Q1/68// (C12P21/02, C12R1:91) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
|---|--|---|
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl ⁶ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/735, C12Q1/68// (C12P21/02, C12R1:91) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | Journal of Immunology, Vol. 146, No. 1 (1991), K. Kobayashi, et al. "the molecular configuration and ultrastructural locations of an IgG Fc binding site in human colonic epithelium" p. 68-74 | 1 - 9 |
| A | Journal of Immunology, Vol. 143, No. 8 (1989), K. Kobayashi, et al. "Identification of a unique IgG Fc binding site in human intestinal epithelium" p. 2567-74 | 1 - 9 |
| A | Digestive Diseases and Sciences, Vol. 39, No. 3 (1994. Mar) K. Kobayashi, et al. "Study of colonic IgG Fc binding site in cultured epithelial cells" p. 526-33 | 1 - 9 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search June 12, 1995 (12. 06. 95) | | Date of mailing of the international search report July 4, 1995 (04. 07. 95) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No. | | Authorized officer Telephone No. |

| | | |
|---|--|--|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl. C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/735, C12Q1/68 // (C12P21/02, C12B1:91) | | |
| B. 調査を行った分野 | | |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl. C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/735, C12Q1/68 // (C12P21/02, C12B1:91) | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | |
| 国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) | | |
| CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | Journal of Immunology, 第146巻, 第1号 (1991), K. Kobayashi, et al. [The molecular configuration and ultrastructural locations of an IgG Fc binding site in human colonic epithelium] p.68-74 | 1-9 |
| A | Journal of Immunology, 第143巻, 第8号(1989), K. Kobayashi, et al. [Identification of a unique IgG Fc binding site in human | 1-9 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 | | 国際調査報告の発送日 |
| 12.06.95 | | 04.07.95 |
| 名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 高 堀 栄 二 電話番号 03-3581-1101 内線 3449 |

C (続き) 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | <p>intestinal epithelium] p.2567-74</p> <p>Digestive Diseases and Sciences, 第39巻, 第3号(1994. Mar) K. Kobayashi, et al. 「Study of colonic IgG Fc binding site in cultured epithelial cells」p.526-33</p> | 1-9 |